

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 15 238.1

Anmeldetag:

6. April 2002

Anmelder/Inhaber:

Cytonet GmbH & Co KG, Weinheim/DE

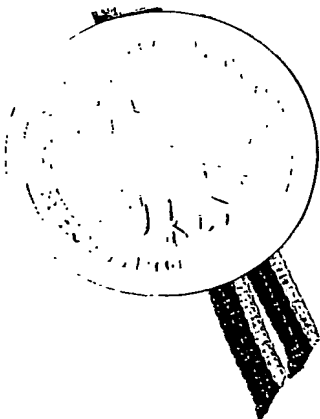
Bezeichnung:

Nachweis von Mykobakterien in klinischem Material

IPC:

C 12 Q, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**



München, den 9. April 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

Dr. jur. Alf-Olav Gleiss, Dipl.-Ing. PA
Rainer Große, Dipl.-Ing. PA
Dr. Andreas Schrell, Dipl.-Biol. PA
Torsten Armin Krüger, RA
Nils Heide, RA
Armin Eugen Stockinger, RA
Georg Brisch, Dipl.-Ing. PA
Erik Graf v. Baudissin, RA

PA: Patentanwalt
European Patent Attorney
European Trademark Attorney
RA: Rechtsanwalt, Attorney-at-law

D-70469 STUTTGART
MAYBACHSTRASSE 6A
Telefon: +49(0)711 81 45 55
Telefax: +49(0)711 81 30 32
E-Mail: office@gleiss-grosse.com
Homepage: www.gleiss-grosse.com

In cooperation with
Shanghai Hua Dong Patent Agency
Shanghai, China

Patentanmeldung

Nachweis von Mykobakterien in klinischem Material

Cytonet GmbH & Co. KG
Albert-Ludwig-Grimm-Str. 20

69469 Weinheim

5 **Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von Mykobakterien und zur Differenzierung des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex und *Mycobacterium avium* von anderen Mykobakterien in klinischem Material.

Die Tuberkulose ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, die chronisch verläuft und jährlich mehr Menschen das Leben kostet als irgendeine andere bakterielle Infektion.

Die Tuberkulose ist insbesondere in der Lunge lokalisiert, seltener in Halslymphknoten, Darm oder Haut. Die sehr unterschiedlichen klinischen Verläufe der Tuberkulose machen daher eine exakte Beschreibung des Krankheitszustands und eine schnelle Diagnose insbesondere zu frühen Erkrankungsstadien notwendig.

Erreger der Tuberkulose sind die Arten: *Mycobacterium tuberculosis* und sehr selten *Mycobacterium bovis*. Diese tuberkulösen Erreger werden allgemein unter dem Begriff „*Mycobacterium tuberculosis*-Komplex“ zusammengefasst.

Eine Folgeerscheinung der chronischen Tuberkulose, die insbesondere durch Streuung der tuberkulösen Erreger im gesamten Organismus ausgelöst wird, ist

beispielsweise die *Meningitis tuberculosa*, die durch Lumbalpunktion diagnostiziert werden kann, wobei allein die eindeutige und frühzeitige Diagnose und die anschließende gezielte intensive Therapie lebensrettend sind. Weitere Folgeerscheinungen lassen sich ebenfalls nur durch eine eindeutige und frühzeitige Diagnose erkennen oder bereits verhindern: *Pleuritis-tuberculosa*, *Peritonitis tuberculosa*, Hauttuberkulose, Knochentuberkulose, Gelenktuberkulose und Urogenitaltuberkulose. Insbesondere die Urogenitaltuberkulose zeichnet sich durch einen schleichenden, symptomarmen Verlauf aus und lässt sich daher oft nicht sofort als solche erkennen, weshalb eine eindeutige und frühzeitige Diagnose bei Patienten notwendig ist.

In den meisten Industrienationen besteht sofortige Meldepflicht bei einer Erkrankung, nicht zuletzt um so schnell wie möglich eine Ausbreitung in der Bevölkerung zu verhindern. In einigen Entwicklungsländern wie Afrika, Asien oder Ozeanien liegt die durchschnittliche Inzidenz bei 200 jährlichen Neuerkrankungen auf 100000 Einwohner. In Westeuropa liegt die durchschnittliche Inzidenz immerhin bei 30 jährlichen Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner, in der Bundesrepublik Deutschland bei ca. 20.

In den letzten Jahren kann ein vermehrtes Auftreten von Tuberkulose sowohl in den Entwicklungsländern als auch in den Industrienationen beobachtet werden, wobei vor allem bei immunsupprimierten HIV-Patienten dadurch regelmäßig Todesfälle verzeichnet werden (8).

Es wird angenommen, dass zur Zeit ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex infiziert ist. Jedoch nicht nur wegen der allgemeinen Gefahr für große Teile der Weltbevölkerung, sondern auch wegen des inzwischen epidemieartigen Auftretens von mehrfach-resistenten Bakterienstämmen (MDRTB) innerhalb oder außerhalb von Krankenhäusern wird die schnelle und eindeutige Diagnose zum Nachweis dieser Bakterienstämme gefordert (9, 14).

Durch die HIV-Epidemie der letzten Jahrzehnte als „Nährboden“ zur Verbreitung von Infektionskrankheiten vermehrte sich außerdem auch das epidemiologische Auftreten von nicht-tuberkulösen Mykobakterien (4). Bei durch nicht-tuberkulöse Mykobakterien verursachten Infektionen sind ähnlich einer „echten“ Tuberkulose Organe wie Lunge, Lymphknoten im Halsbereich oder die Haut betroffen. Selten kommt es zu einer Streuung der nicht-tuberkulösen Erreger in den gesamten Organismus, wobei Folgeerscheinungen ähnlich wie bei einer „echten“ Tuberkulose beobachtet werden können. Nicht-tuberkulöse Mykobakterien führen bei Patienten, die beispielsweise an zystischer Fibrose erkrankt sind, zu einer zusätzlichen Verschlechterung des Krankheitsbildes im Bereich der Lunge (1, 2, 16).

Zu den nicht-tuberkulösen Mykobakterien, die in der klinischen Praxis beobachtet werden, zählen: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* und *Mycobacterium abscessus* (4).

Die Diagnostik von Mykobakterien in klinischem Material sollte idealer Weise einen spezifischen Nachweis von tuberkulösen und von nicht-tuberkulösen Mykobakterien erlauben.

- 5 In den letzten Jahren wurden zur klinischen Diagnose von Mykobakterien im Labor verstärkt molekularbiologische Techniken basierend auf einer Nucleinsäure-Vervielfachung, insbesondere Amplifikation, wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt.
- 10 PCR-Verfahren zur Amplifikation einer Vielzahl verschiedener chromosomaler DNA-Fragmente wurden zur Detektion von sowohl Gattungs-spezifischen als auch von *M. tuberculosis*-spezifischen DNA-Regionen eingesetzt (15).
- 15 Gattungs-spezifische Verfahren werden eingesetzt, um eine Mykobakterien-Infektion gegenüber anderen Infektionen abzugrenzen. Bekannte Gattungsspezifische Verfahren zielen dabei auf das 16S-rRNA-Gen oder das Gen des 65 kDa-„heat shock“-
- 20 Proteins. Eine anschließende spezifische Identifikation einiger Mykobakterienarten wird mit konservierten Hybridisierungs sonden durchgeführt (5, 12). Alternativ werden die amplifizierten Gene sequenziert (6) oder es wird eine Analyse mittels Restriktionsenzymen durchgeführt (15).
- 25

Zu den spezifischen DNA-Regionen, die zum Art-spezifischen Nachweis des *M. tuberculosis*-Komplex mittels PCR eingesetzt werden, zählen beispielsweise IS 6110, die Gene des 38 kDa-Proteins, die Gene des MBP 64-Proteins sowie die Regionen mtp40 oder

30 pMTb4.

Abgesehen von diesen individuellen Laborverfahren existieren kommerziell erhältliche Diagnose-Kits, die meist ausschließlich zur Diagnose des *M. tuberculosis*-Komplex geeignet sind. Bekannte Kits werden
5 beispielsweise von Roche-Amplikor™, Geneprobe™ oder Abbot™ angeboten.

Die molekularbiologischen Verfahren, die zu diesem Zweck durchgeführt werden, beinhalten einerseits die Vervielfältigung der nachzuweisenden Nucleinsäure (Targetamplifikation), beispielsweise durch
10 die PCR, durch die Transkriptions-basierte isotherme DNA-Synthese (TMA), durch die Ligase-Kettenreaktion (LCR) oder durch die isotherme Strangverdrängungs-Amplifikation (SDA), andererseits die Vervielfältigung der signalgebenden Komponente (Signalamplifikation), wie durch die isotherme Q β -Replikation.
15

Bezeichnend für die heutige Situation ist die Tatsache, dass es bis jetzt noch keine Methode gibt,
20 die als allgemein anerkannter Diagnose-Standard akzeptiert ist. Der Nachweis von Mykobakterien mit Hilfe von molekularen Methoden wird in Deutschland inzwischen zweimal pro Jahr durch eine nationale Qualitätskontrolle überprüft. In diesen Ringversuchen zeigten sich Schwächen bei den kommerziell erhältlichen Diagnose-Kits und bei verschiedenen Eigenentwicklungen, vor allen bei der Anwendung mit stark verdünnten Proben. Es wird davon ausgegangen,
25 dass es sich hierbei um systematische Schwächen der jeweils zugrunde liegenden Nachweisreaktionen handelt. Daher werden alle bisher bestehenden Methoden
30

als unbefriedigend und deshalb verbesserungswürdig angesehen.

Weitere wesentliche Nachteile der kommerziell erhältlichen Verfahren sind insbesondere (a) eine
5 fehlende Möglichkeit der Unterscheidung zwischen dem *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex und nicht-tuberkulösen Mykobakterien, (b) eine mögliche unspezifische Inhibition der Amplifikationsreaktion im Nachweisverfahren bei klinischen Proben, (c) ei-
10 ne lange Untersuchungsdauer (über mehrere Stunden) und (d) eine Beschränkung des einsetzbaren klinischen Materials insbesondere auf Proben aus dem Respirationstrakt.

Das 16S-rRNA-Gen wird bereits zum Nachweis und zur
15 Identifizierung verschiedener humanpathogener Mykobakterien mittels PCR eingesetzt (7). Basierend auf diesem 16S-rRNA-Nachweissystem wird ein Algorithmus zur spezifischen Vervielfältigung eines 1000 bp
20 Fragments der mykobakteriellen 16S-rRNA mittels eines unspezifischen Primers und eines Gattungsspezifischen Primers für Mykobakterien vorgeschlagen. Zur Bestätigung, ob das richtige Fragment vervielfältigt wird, werden dabei Gattungsspezifische
25 Oligonucleotid-Sonden eingesetzt, die mit dem amplifizierten Fragment hybridisieren. Im weiteren Verlauf werden Art-spezifische Hybridisierungssonden eingesetzt, wobei anhand desselben amplifizierten Fragments die Mykobakterienarten *M. tuberculosis*-Komplex und *M. avium* gegenüber anderen Bakteri-
30 enarten unterschieden werden können (5). Wesentliche Nachteile dieser mehrstufigen Verfahren bestehen darin, dass diese Nachweisverfahren auf zum

Teil aufwändigen Hybridisierungsverfahren basieren und den Einsatz hochqualifizierter Personen erfordert. Darüber hinaus müssen diese Nachweisverfahren mindestens über Nacht angesetzt werden; ein Ergebnis steht also frühestens am nächsten Tag nach Probenbereitstellung zur Verfügung (5, 6). Patienten müssen bis zum Vorliegen der Untersuchungsergebnisse meist stationär aufgenommen werden. Für die klinische Routinediagnose sind diese Verfahren daher nur sehr bedingt einsetzbar.

Aus dem Stand der Technik ist daher bisher kein für den klinischen Routineeinsatz geeignetes Verfahren bekannt, das sich insbesondere durch einfache Anwendung auszeichnet und womit es gelingt, *M. tuberculosis* und *M. avium* schneller und spezifisch in klinischem Material wie Sputum, Bronchial-Lavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Knochenmark, Blut oder Biopsien, insbesondere Punktatbiopsien, nachzuweisen und im gleichen Verfahren eine Mykobakterien-Infektion eindeutig von anderen mikrobiellen Infektionen abzugrenzen.

DNA extrahiert aus klinischen Proben enthält Verunreinigungen, die oft dazu führen, dass die Enzymbasierte Amplifikation, insbesondere die PCR, gehemmt wird. So besteht bei den bisher bekannten Nachweisverfahren die große Gefahr, dass ein negatives Ergebnis erhalten wird, obwohl tatsächlich eine Mykobakterieninfektion beim Patienten vorliegt. Im schlimmsten Fall wird dadurch eine bestehende Tuberkulose übersehen. Es besteht daher seit langem auch das Bedürfnis, ein Kontrollsystem zu entwickeln, das sogenannte „falsch-negative“ Befun-

de im Nachweisverfahren ausschließt (Inhibitionskontrolle).

Es ist bekannt, dass der Einsatz der Echtzeit-PCR (Rapid-Cycle-PCR), die beispielsweise mit einem
5 Luft-temperierten System ausgestattet ist und somit wesentlich geringere Transitionszeiten gegenüber einer herkömmlichen PCR aufweist, zu einer deutlich verminderten Zeit bis zum Nachweis von beispielsweise *M. tuberculosis* führt (2).

10 Darüber hinaus stellen fluorimetrische Messungen, insbesondere, wenn sie Rahmen des Echtzeit-PCR-Verfahren eingesetzt werden, eine schnelle und empfindliche Methode zum Nachweis von amplifizierten Genfragmenten dar. In (3) wurde eine Echtzeit-
15 Fluorimetrie zum Nachweis von *M. tuberculosis* in Expectoraten unter Verwendung des TaqMan™-Systems eingesetzt.

Das LightCycler™-System der Firma Roche Molecular Biochemicals, das eine Ausgestaltung der Echtzeit-
20 PCR ist, wurde inzwischen ebenfalls zum Nachweis von *M. bovis* in Rinderstuhl sowie zum Nachweis von Rifampin- oder Isoniazid-Resistenz-bedingten Mutationen in *M. tuberculosis* eingesetzt (11, 13). In diesen beiden Studien waren die vervielfachten
25 Fragmente typischerweise 200 Basenpaare lang. Aufgrund des hohen Durchsatzes eines LightCycler™-Systems wird nämlich bisher davon ausgegangen, dass eine Vervielfachung von größeren DNA-Fragmenten von Mykobakterien aufgrund des in Mykobakterien vorkom-
30 menden hohen CG-Nukleotidgehaltes von ca. 65 % bis zu 75 % schwierig bis unmöglich ist.

Ausgehend vom Stand der Technik besteht ein wesentlicher Nachteil der bisher bekannten Nachweisreaktionen darin, dass Mykobakterien-Infektionen in klinischem Material bisher noch nicht eindeutig gegenüber nicht-mykobakteriellen Infektionen abgegrenzt werden können: Aus dem Stand der Technik ist die Gattungsspezifische Region II, „genus II“, auf dem 16S-rRNA-Gen von Mykobakterien bekannt, wobei mittels eines spezifischen Hybridisierungssonden-Paars und einer Schmelzkurvenanalyse eine Vielzahl von Mykobakterienarten aufgrund eines höheren Schmelzpunktes des Sonden-Paars von anderen Bakterien-Arten und anderen Mikroorganismen unterschieden werden können (6). Jedoch weisen auch bestimmte Mykobakterienarten wie *M. triviale*, *M. agri*, *M. Xenopi* oder *M. chitae* einen niedrigen Schmelzpunkt auf, so dass nach dem Stand der Technik eine eindeutige Abgrenzung der Mykobakterien von Nicht-Mykobakterien, insbesondere in einem einzigen Verfahrensschritt, gar nicht möglich ist.

Vor diesem Hintergrund liegt das technische Problem der vorliegenden Erfindung darin, ein verbessertes Verfahren bereitzustellen, das insbesondere einen besonders schnellen und gleichzeitig spezifischeren Nachweis von Mykobakterien-Infektionen in klinischem Material verschiedenen Ursprungs und die Identifizierung der Arten *M. tuberculosis*-Komplex und/oder *M. avium* in einem gemeinsamen Nachweisverfahren ermöglicht.

Die vorliegende Erfindung löst das technische Problem durch die Bereitstellung eines Verfahrens zum gemeinsamen, spezifischen Nachweis einer Mykobakte-

rien-Infektion und des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex und/oder von *Mycobacterium avium* gegenüber anderen Mykobakterienarten in klinischem Material, wobei

5 (a) mikrobielle DNA aus dem klinischen Material extrahiert wird und anschließend

(b) mindestens ein Fragment des 16S-rRNA-Gens aus der mikrobiellen DNA mit einem Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 5
10 amplifiziert wird

oder
mit zwei Primerpaaren, wobei das eine Primerpaar die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 3 umfasst und das andere Primerpaar unmittelbar davor
15 oder danach oder gleichzeitig eingesetzt wird und die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 5 umfasst, amplifiziert wird und anschließend

(c) das mindestens eine amplifizierte 16S-rRNA-Genfragment mittels mindestens eines Paares markierter Hybridisierungs sonden, die mit hypervariablen Art-spezifischen Regionen des 16S-rRNA-Fragments von Mykobakterien hybridisieren, detektiert wird, wobei das Paar markierter Hybridisierungs sonden zum Nachweis des *M. tuberculosis*-Komplex die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 7 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon beinhaltet und wobei das Paar der markierten Hybridisierungs sonden zum Nachweis von *M. avium* die Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 8/SEQ ID NO: 9
20
25
30 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon beinhaltet, und anschließend, gleichzeitig oder zeitlich unmittelbar davor

(d) das mindestens eine amplifizierte 16S-rRNA-Genfragment mittels eines Paares markierter Hybridisierungssonden, das mit der Gattungsspezifischen Region III des 16S-rRNA-Fragments hybridisiert, detektiert wird, wobei das Paar die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 11 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon beinhaltet, und wobei

(e) der spezifische Nachweis der Mykobakterien-Gattung und der Nachweis des *M. tuberculosis*-Komplex und/oder von *M. avium* in den Schritten (c) und (d) mittels Schmelzkurvenanalyse erfolgt.

Die Erfindung sieht vorteilhafterweise also vor, dass in einem einheitlichen gemeinsamen Verfahrensgang der Nachweis von Mykobakterien als Gattung zusammen mit dem Art-spezifischen Nachweis von *M. tuberculosis*-Komplex ermöglicht wird. Die Erfindung ermöglicht auch einen gemeinsamen einheitlichen spezifischen Nachweis der Gattung *Mycobacterium* zusammen mit dem Art-spezifischen Nachweis von *M. avium*. Schließlich ermöglicht die Erfindung auch den gemeinsamen spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Mycobacterium* zusammen mit dem Art-spezifischen Nachweis von *M. tuberculosis*-Komplex und von *M. avium*.

Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass in dem eingesetzten kombinierten Nachweisverfahren zur Diagnose von Mykobakterien-Infektionen sowohl eine bestehende Mykobakterien-Infektion gegenüber anderen mikrobiellen Infektion als auch eine bestehende Tuberkulose gegenüber nicht-tuberkulösen Infektionen eindeutig und sicher

erkannt werden kann. Dieser Nachweis war in so vorteilhafter Weise nach dem Stand der Technik nicht möglich.

5 Der eindeutige Nachweis einer Mykobakterien-
Infektion gegenüber anderen mikrobiellen Infektio-
nen findet erfindungsgemäß durch Analyse der
Schmelztemperaturen der Hybridisierung des Gat-
tungs-spezifischen Hybridisierungssonden-Paars, das
10 die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 11
oder das Paar der komplementären Sequenzen davon
beinhaltet, mit der Gattungs-spezifischen Region
III des 16S-rRNA-Gens statt. In den erfindungsgemä-
ßen Nachweisverfahren zeichnen sich Mykobakterien-
15 Stämme durch Schmelztemperaturen von mindestens
55°C, insbesondere von 55°C und 61,5°C aus. In ei-
ner weiteren Variante dieses Nachweisverfahrens
kann bei Auftreten der Schmelztemperatur von 55°C
der Mykobakterien-Stamm *M. chelonae* eindeutig ge-
20 genüber allen anderen Mykobakterien-Stämmen, die
insbesondere eine Schmelztemperatur von 61,5°C auf-
weisen, identifiziert und eine Mykobakterien-
Infektion durch *M. chelonae* nachgewiesen werden.

Als weiterer Vorteil erlaubt das erfindungsgemäße
Verfahren neben dem eindeutigen und sicheren Nach-
25 weis einer tuberkulösen Infektion den eindeutigen
und sicheren Nachweis einer nicht-tuberkulösen In-
fektion ausgelöst durch *M. avium*.

Der eindeutige Nachweis einer tuberkulösen Infekti-
on durch Stämme des *M. tuberculosis*-Komplex findet
30 erfindungsgemäß durch Analyse der Schmelztemperatu-
ren der Hybridisierung des Art-spezifischen Hybri-

- disierungssonden-Paars für den *M. tuberculosis*-Komplex, das die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 7 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon beinhaltet, mit der Art-spezifischen Region des 16S-rRNA-Gens statt. In den erfindungsgemäßen Nachweisverfahren zeichnen sich Stämme des *M. tuberculosis*-Komplex durch Schmelztemperaturen von mindestens 55°C, insbesondere von 64°C aus.
- 10 Der eindeutige Nachweis einer tuberkulösen Infektion durch *M. avium* findet erfindungsgemäß durch Analyse der Schmelztemperaturen der Hybridisierung des Art-spezifischen Hybridisierungssonden-Paars für *M. avium*, das die Nucleotidsequenzen SEQ ID
- 15 NO: 8/SEQ ID NO: 9 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon beinhaltet, mit der Art-spezifischen Region des 16S-rRNA-Gens statt. In den erfindungsgemäßen Nachweisverfahren zeichnet sich *M. avium* durch Schmelztemperaturen von mindestens
- 20 55°C, insbesondere von 61°C aus.
- Erfindungsgemäß bevorzugt wird das vorgenannte Verfahren mit einem erfindungsgemäßen internen Standard in Form von künstlichen Plasmiden, Kontrollplasmiden, zur Identifizierung sogenannter
- 25 „falsch-negativer“ Befunde durchgeführt. In einer Variante ist dazu vorgesehen, dass ein erster Teil der extrahierten mikrobiellen DNA dem vorgenannten Verfahren mit den Schritten (a) bis (e) unterzogen wird und ein zweiter Teil der extrahierten mikro-
- 30 biellen DNA in einem zum vorgenannten Verfahren parallelen Ansatz

(a') mit mindestens einem künstlichen Plasmid vorzugsweise subcloniert in pGEM-T, das als interner Standard dient, vermischt wird, wobei das künstliche Plasmid eine Gattungsspezifische Region III der 16S-rRNA mit einer modifizierten Nucleotidsequenz umfasst, und anschließend

(b') Fragmente der modifizierten 16S-rRNA-Gene mittels mindestens eines Primerpaares ausgewählt aus der Gruppe der Primerpaare bestehend aus den Nucleotidsequenz-Paaren SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 5 vervielfacht werden und anschließend

(c') die vervielfachten 16S-rRNA-Fragmente mittels eines Paares markierter Hybridisierungssonden detektiert werden, die mit der modifizierten Gattungsspezifischen Region III hybridisieren, wobei das Paar der markierten Hybridisierungssonden die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 11 umfasst und wobei

(d') während der Detektion der spezifische Nachweis der 16S-rRNA-Fragmente von Mykobakterien und der modifizierten 16S-rRNA-Fragmente des internen Standards mittels Schmelzkurvenanalyse erfolgt.

In einer weiteren bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Schritte (a), (b), (c), (d) und (e) des vorgenannten Verfahrens durchgeführt, wobei das mindestens eine künstliche Plasmid in Schritt (a) mit der gesamten extrahierten mikrobiellen DNA vermischt wird und nach Amplifikation gemäß Schritt (b) die Detektion und Schmelzkurvenanalyse zum Nachweis der vervielfachten 16S-rRNA-Fragmente von Mykobakterien und der

modifizierten 16S-rRNA-Fragmente des internen Standards, insbesondere gleichzeitig, gemäß der Schritte (c') und (d') durchgeführt wird.

5 Durch den Einsatz eines Kontrollplasmids im erfindungsgemäßen Nachweisverfahren gelingt es vorteilhaft, den Erfolg der Amplifikationsreaktion bereits während der Nachweisreaktion von Mykobakterien zu kontrollieren, um damit besonders schnell ein sicheres und eindeutiges Ergebnis zu erhalten. Insbe-
10 sondere sogenannte „falsch-negative“ Befunde bei Hemmung der Amplifikation sind durch Verwendung des erfindungsgemäßen Plasmids als interner Standard praktisch ausgeschlossen. Damit sind Spezifität und Selektivität des erfindungsgemäßen Verfahrens ge-
15 genüber dem Stand der Technik deutlich erhöht.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter den Formulierungen „Primerpaar beinhaltend oder umfassend die Nucleotidsequenzen“, „ein Paar Hybridisierungssonden beinhaltend oder umfassend
20 die Nucleotidsequenzen“ oder ähnlichen verstanden, dass die jeweiligen Nucleotidsequenzen oder das Paar von Nucleotidsequenzen jeweils die in Bezug genommenen Nucleotidsequenzen aufweisen/aufweist, das heißt, dass diese Nucleotidsequenzen oder das
25 Paar davon aus den konkret genannten Nucleotidsequenz allein bestehen/besteht oder gegebenenfalls weitere Sequenzen umfassen/umfasst.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem Begriff „*Mycobacterium tuberculosis*-Komplex“ die tuberkulösen Mykobakterienarten
30 *Mycobacterium tuberculosis*, insbesondere der Stamm

H37Rv, und *Mycobacterium bovis*, insbesondere der Stamm R99, wobei diese Stämme Erreger der Krankheit Tuberkulose sind, sowie der Stamm BCG Pasteur des *Mycobacterium bovis* verstanden.

- 5 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff „tuberkulös“ eine Eigenschaft beschrieben, die sich auf *Mycobacterium tuberculosis*, insbesondere den Stamm H37Rv, und *Mycobacterium bovis*, insbesondere den Stamm R99, im engeren Sinne
10 sowie auf den Stamm BCG Pasteur des *Mycobacterium bovis* im weiteren Sinne bezieht und das Krankheitsbild der Tuberkulose bewirkt.

- Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter der Bezeichnung „*Mycobacterium avium*“ die
15 nicht-tuberkulösen Mykobakterienarten *Mycobacterium avium*, insbesondere der Stamm ATCC35712, und deren Unterart *Mycobacterium paratuberculosis*, insbesondere der Stamm Pat.6783, verstanden.

- Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff „nicht-tuberkulös“ eine Eigenschaft verstanden, die im Zusammenhang mit einer
20 anderen Erkrankung als der Tuberkulose steht und insbesondere eine Mykobakteriose ist.

- Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter klinischem Material klinische Proben wie
25 Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Liquor, Knochenmark, Blut oder Biopsien, insbesondere Punktat-Biopsien, beispielsweise aus Halslymphknoten, verstanden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff „modifizierte Nucleotidsequenz“ eine Nucleinsäuresequenz verstanden, die sich durch Austausch, Inversion, Deletion oder Addition von
5 mindestens einem Nucleotid, auch einem ungewöhnlichen oder synthetischen Nucleotid, von ihrer ursprünglichen Sequenz, d.h. der Wildtyp-Sequenz, in mindestens einem Nucleotid, bevorzugt in zwei Nucleotiden, unterscheidet. In diesem Zusammenhang
10 wird unter dem Begriff „modifiziert“ eine Eigenschaft verstanden, die sich auf eine „modifizierte Nucleotidsequenz“ bezieht.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorgenannten Verfahren wird die Amplifikation der Genfragmente des 16S-rRNA-Gens mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Bevorzugt wird die Amplifikation mittels Echtzeit-PCR (Rapid-Cycle-PCR) durchgeführt. Im Echtzeit-PCR Verfahren ist es möglich, die Vervielfachung der PCR-Produkte
15 in Echtzeit Amplifikations-Zyklus für Amplifikations-Zyklus zu beobachten. Besonders bevorzugt wird die Amplifikation in einem LightCyclerTM-System der Firma Roche Molecular Biochemicals durchgeführt, das eine Ausgestaltung der Echtzeit-PCR ist.
20

25 Zu diesem Zweck werden insbesondere der PCR-Ausgangsmischung neben der Polymerase, den Nucleotiden, den Pufferlösungen und den Primern auch Hybridisierungs-sonden zugegeben, die spezifisch an die gewünschten PCR-Amplifikationsprodukte binden.
30 Dabei werden insbesondere zwei Sequenz-spezifische Oligonucleotid-Sonden verwendet, die mit verschiedenen Farbstoffen markiert sind. Die Sequenzen der

erfindungsgemäßen markierten Hybridisierungssonden-
Paare sind so ausgewählt, dass sie auf eine Weise
an die Zielsequenzen des amplifizierten DNA-
Fragments hybridisieren, dass insbesondere das 3'-
5 Ende der einen Sonde dicht bei dem 5'-Ende der an-
deren Sonde liegt, wodurch die beiden Farbstoffe in
unmittelbare Nachbarschaft zueinander gebracht wer-
den, insbesondere beträgt der Abstand zwischen den
beiden Sonden zwischen 1 und 5 Nucleotide. Insbe-
10 sondere kommt es zu einem Fluoreszenz-Resonanz-
Energietransfer (FRET) zwischen den beiden Farb-
stoffen der Hybridisierungssonden und damit zu ei-
ner Verschiebung des Fluoreszenzspektrums, wobei
das Maß an Fluoreszenz in diesem Wellenlängenbe-
15 reich eine Funktion der Menge an detektierter DNA
ist.

Durch das FRET-System sind erfindungsgemäß quanti-
tative Messungen der Menge amplifizierter DNA-
Fragmente vorgesehen. Die erfindungsgemäßen ausge-
20 wählten Hybridisierungssonden können quantitativ,
also stöchiometrisch, an die amplifizierten Frag-
mente binden. Dabei ist die quantitative Hybridi-
sierung insbesondere abhängig von der Temperatur
und dem Homologiegrad der verwendeten Oligo-
25 nucleotid-Sonden mit der detektierten Sequenz auf
dem amplifizierten Fragment.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die vor-
genannte fluorimetrische Detektion spezifischer
DNA-Sequenzen in den amplifizierten Fragmenten nach
30 einer Amplifikation der Fragmente mittels herkömm-
licher PCR durchgeführt. In einer besonders bevor-
zugten Ausführungsform wird die fluorimetrische De-

tektion in einer Echtzeit-PCR während der Amplifikationsreaktionen durchgeführt, wobei beispielsweise die Zunahme an produzierter DNA als Zunahme im Fluoreszenzsignal verfolgt werden kann.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform des vorgenannten erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die spezifische Detektion Art-spezifischer und/oder Gattungs-spezifischer Regionen im amplifizierten DNA-Fragment nach Beendigung der Amplifikationsreaktion, wobei nach Hybridisierung des Hybridisierungssonden-Paars, bevorzugt eines FRET-Paars an die zu detektierenden Regionen die Temperatur im Rahmen einer Schmelzkurvenanalyse verändert wird, bevorzugt kontinuierlich erhöht wird, und gleichzeitig
10 die in Abhängigkeit von der Temperatur emittierte Fluoreszenz gemessen wird. Auf diese Weise wird eine Schmelztemperatur bestimmt, bei der die Hybridisierungssonden, insbesondere das eingesetzte FRET-Paar, gerade nicht mehr an die zu detektierende Region des amplifizierten DNA-Fragments hybridisieren. Der wesentliche Aspekt einer Schmelzkurvenanalyse besteht darin, dass es bei Auftreten von Fehlpaarungen zwischen dem eingesetzten Hybridisierungssonden-Paar und der Zielregion auf dem amplifizierten DNA-Fragment zu einer Reduktion des gemessenen Schmelzpunktes kommt. Auf diese Weise werden erfindungsgemäß mit Hybridisierungssonden, insbesondere mit einem FRET-Paar, die Regionen von DNA-Fragmenten identifiziert, deren Sequenzen sich
20 voneinander nur geringfügig, insbesondere durch eine oder wenige Punktmutationen, in der Nucleotidsequenz unterscheiden.
25
30

In vorteilhafter Weise besitzt das 16S-rRNA-Gen von Mykobakterien sowohl konservierte als auch hochvariable Regionen, die beispielsweise eine Gattungsspezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Gattungsspezifischer Primer erlaubt. Erfindungsgemäß werden daher die vorgenannten Verfahren der Fluoreszenzdetektion in Verbindung mit der Schmelzkurvenanalyse zum spezifischen Nachweis der Gattungsspezifischen Region III und der hypervariablen Art-spezifischen Regionen des *M. tuberculosis*-Komplex und *M. avium* auf dem 16S-rRNA-Gen eingesetzt.

Aus dem Stand der Technik ist bekannt, dass mykobakterielle 16S-rRNA-Gene jeweils zwei Art-spezifische und zwei Gattungsspezifische Regionen enthalten, siehe Figur 1: ,species (A)' und ,species (B)' beziehungsweise ,genus II' und ,genus I'. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird eine dritte Gattungsspezifische Region auf dem 16S-rRNA-Gen beschrieben, siehe Figur 1: ,genus III' (erfindungsgemäß).

In Figur 1 sind zusätzlich schematisch die Primerpaare dargestellt, die zur Amplifikation der ausgewählten Art-spezifischen beziehungsweise Gattungsspezifischen Regionen verwendet werden.

Erfindungsgemäß wird zur Amplifikation der Gattungsspezifischen Region III 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien das Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 5 eingesetzt. In einer bevorzugten Variante besteht das Primerpaar aus degenerierten oder mutierten Sequenzen

oder Fragmenten davon, die jeweils mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 5 hybridisieren, wovon sie abgeleitet sind, wobei jeweils ein Homologiegrad von mindestens 90 %, bevorzugt von mindestens 95 %, besonders bevorzugt von mindestens 98 % besteht.

Das mit den vorgenannten Primerpaar amplifizierte 1000 bp lange Fragment enthält sowohl die konservierte Gattungs-spezifische Region III als auch die hochvariablen Art-spezifischen Regionen des *M. tuberculosis*-Komplex und *M. avium*.

Als besonders überraschend wurde mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gefunden, dass insbesondere mit dem LightCyclerTM-System -im Gegensatz zur gängigen Lehrmeinung- eine effektive Amplifikation dieses 1000 bp Fragments und der erfindungsgemäße Nachweis der Gattungs- und Art-spezifischen Regionen auf diesem Fragment erzielt werden konnte, obwohl dieses Fragment aus Mykobakterien einen hohen GC-Gehalt besitzt. Erfindungsgemäß bevorzugt kann daher mittels eines einzigen amplifizierten Fragments des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien ein Gattungsspezifischer Nachweis einer Mykobakterien-Infektion gegenüber anderen mikrobiellen Infektionen und der Art-spezifische Nachweis des *M. tuberculosis*-Komplex und *M. avium* durchgeführt werden.

Erfindungsgemäß ist außerdem die zusätzliche oder alternative Verwendung von zwei weiteren Primerpaaren vorgesehen, wobei ein Primerpaar ein insbesondere 300 bp langes Fragment des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien amplifiziert, das die Art-

spezifischen Regionen des *M. tuberculosis*-Komplex und *M. avium* enthält, wobei dieses Primerpaar aus den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 3 besteht, und das zweite Primerpaar ein 100 bp langes Fragment desselben Gens amplifiziert, das die Gattungs-spezifische Region III enthält, wobei dieses Primerpaar die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 5 umfasst. In einer bevorzugten Variante bestehen die zwei Primerpaare aus den Paaren degenerierter oder mutierter Sequenzen oder Fragmenten davon, die jeweils mit den Nucleotidsequenz-Paaren SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 5 hybridisieren, wovon sie abgeleitet sind, wobei jeweils ein Homologiegrad von mindestens 90 %, bevorzugt von mindestens 95 %, besonders bevorzugt von mindestens 98 % besteht.

Erfindungsgemäß wird zur Detektion der vorgenannten amplifizierten 16S-rRNA-Fragmente von Mykobakterien, die die Gattungs-spezifische Region III und/oder die Art-spezifischen Regionen des *M. tuberculosis*-Komplex und *M. avium* enthalten, ein Paar markierter Hybridisierungssonden eingesetzt, das mit der konservierten Gattungs-spezifischen Region III hybridisiert, wobei dieses Paar die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 11 oder die komplementären Sequenzen davon beinhaltet. Bevorzugt wird dabei das Hybridisierungssonden-Paar als FRET-Paar ausgeführt, wobei die Hybridisierungssonde mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 10 oder der komplementären Sequenz davon als Donor-Komponente (= Anker-Sonde) ausgeführt ist, die vorzugsweise am 3'-terminalen Nucleotid mit einem Farbstoff, vorzugsweise mit einem Fluoreszenz-Farbstoff, besonders

bevorzugt mit Fluorescein assoziiert ist, und die zweite Hybridisierungssonde bestehend aus der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 11 oder der komplementären Sequenz davon als Akzeptor-Komponente (= Sensor-Sonde) ausgeführt ist, die vorzugsweise am 5'-terminalen Nucleotid mit einem weiteren Farbstoff, vorzugsweise mit einem Rhodamin-Derivat assoziiert ist.

10 Erfindungsgemäß wird die Detektion der vorgenannten die Art-spezifischen Regionen enthaltenden 16S-rRNA-Fragmente mit mindestens einem Paar markierter Hybridisierungssonden durchgeführt, wobei bevorzugt die markierten Hybridisierungssonden-Paare als FRET-Paare ausgeführt sind. Dabei werden analog zum
15 Vorgenannten zur spezifischen Detektion der Mykobakterienarten *M. tuberculosis*-Komplex und *M. avium* die erfindungsgemäßen Art-spezifischen Hybridisierungssonden-Paare eingesetzt, wobei jeweils ein Hybridisierungssonden-Partner (SEQ ID NO: 6 oder
20 das Komplement beziehungsweise SEQ ID NO: 8 oder das Komplement) als Donor-Komponente (= Anker-Sonde) ausgeführt ist, die vorzugsweise am 3'-terminalen Nucleotid mit einem Farbstoff, vorzugsweise mit einem Fluoreszenz-Farbstoff, besonders
25 bevorzugt mit Fluorescein assoziiert ist und der jeweils andere Hybridisierungssonden-Partner (SEQ ID NO. 7 oder Komplement beziehungsweise SEQ ID NO: 9 oder Komplement) als Akzeptor-Komponente (= Sensor-Sonde) ausgeführt ist, die vorzugsweise am
30 5'-terminalen Nucleotid mit einem weiteren Farbstoff, vorzugsweise mit einem Rhodamin-Derivat assoziiert ist.

In bevorzugten Varianten der vorgenannten Ausführungsformen ist das Rhodamin-Derivat LightCycler-Red 640; in weiteren bevorzugten Varianten der vorgenannten Ausführungsform ist das Rhodamin-Derivat
5 LightCycler-Red 705; in weiteren bevorzugten Varianten der vorgenannten Ausführungsform ist das Rhodamin-Derivat Cy5.

10 In einer Variante des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens werden zur Markierung der Hybridisierungssonden-Paare jeweils diesselben Donor-Akzeptor-Farbstoffe verwendet, bevorzugt Fluorescein/LightCycler-Red 640, wobei die Schmelzkurvenanalyse mit dem Gattungsspezifischen Sonden-Paar zum Nachweis von Mykobakterien zeitlich oder räumlich
15 getrennt von der Schmelzkurvenanalyse mit einem der Art-spezifischen Hybridisierungssonden-Paare zum Nachweis des *M. tuberculosis*-Komplex oder von *M. avium* insbesondere in jeweils parallelen Ansätzen erfolgt.

20 In einer weiteren Variante des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens werden zur Markierung der Hybridisierungssonden-Paare jeweils verschiedene Donor-Akzeptor-Farbstoffe verwendet, wobei die Schmelzkurvenanalyse mit dem Gattungsspezifischen Sonden-Paar zum Nachweis von Mykobakterien, das bevorzugt
25 mit Fluorescein/LightCycler-Red 640 markiert ist, zeitlich und räumlich zusammen in einem Ansatz mit der Schmelzkurvenanalyse mit einem der Art-spezifischen Hybridisierungssonden-Paare, das bevorzugt mit Fluorescein/LightCycler-Red 705
30 markiert ist, zum Nachweis des *M. tuberculosis*-Komplex oder von *M. avium* erfolgt, wobei bevorzugt im

LightCycler™-System die Fluoreszenz des Gattungsspezifischen Sonden-Paars mit einem Photodetektor-Kanal und die Fluoreszenz eines Art-spezifischen Sonden-Paars mit dem zweiten Photodetektor-Kanal registriert wird.

In diesem Zusammenhang sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung Oligonucleotid-Primer-Paare zur Vervielfältigung von 16S-rRNA-Fragmenten aus extrahierter bakterieller DNA zum spezifischen Nachweis von Mykobakterien und zur Unterscheidung des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex und *Mycobacterium avium* von anderen Mykobakterienarten in klinischem Material, wobei ein Primerpaar die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 3 oder ein Paar degenerierter oder mutierter Nucleotidsequenzen oder Fragmente davon umfasst. Die degenerierten oder mutierten Nucleotidsequenzen haben die Eigenschaft, jeweils mit den Sequenzen SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 3 zu hybridisieren, wobei jeweils ein Homologiegrad von mindestens 90 %, bevorzugt von mindestens 95 %, besonders bevorzugt von mindestens 98 %, bevorzugt ist.

Die Erfindung betrifft auch ein zweites Primerpaar mit einem Primer mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 4 oder einer degenerierten oder mutierten Nucleotidsequenz oder ein Fragment davon, das mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 hybridisiert, wobei ein Homologiegrad von mindestens 90 %, bevorzugt von mindestens 95 %, besonders bevorzugt von mindestens 98 % bevorzugt ist.

- In diesem Zusammenhang sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung Oligonucleotid-Hybridisierungssonden-Paare zum spezifischen Nachweis von Mykobakterien und zur Unterscheidung des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex und *Mycobacterium avium* von anderen Mykobakterienarten in klinischem Material, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 11 oder dem Paar der komplementären Sequenzen davon, den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 7 oder dem Paar der komplementären Sequenzen davon und den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8/SEQ ID NO: 9 oder dem Paar der komplementären Sequenzen davon.
- 15 In diesem Zusammenhang ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein künstliches Plasmid, Kontrollplasmid, vorzugsweise erhalten durch Subclonierung des 16S-rRNA-Gens in pGEM-T, das als interne Kontrolle der Amplifikation (Inhibitionskontrolle) und des spezifischen Nachweises von 16S-rRNA-Fragmenten von Mykobakterien dient und eine Nucleinsäuresequenz der modifizierten Gattungsspezifischen Region III des 16S-rRNA-Gens enthält. Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Kontrollplasmid durch Nucleotid-Austausch, Nucleotid-Addition, Nucleotid-Deletion und/oder Nucleotid-Inversion mindestens eines Nucleotids, bevorzugt zweier Nucleotide von der Wildtyp-Nucleinsäuresequenz der Gattungsspezifischen Region III des 16S-rRNA-Gens abgeleitet. In einer weiteren Variante umfasst das künstliche Plasmid die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 14 oder SEQ ID NO: 15, worin jeweils ein Nucleotid gegenüber der Wildtyp-Sequenz

ausgetauscht ist. Besonders überraschend wurde dabei gefunden, dass durch den Ersatz des einen Nucleotids eine Reduktion der Schmelztemperatur der Gattungsspezifischen Hybridisierungssonden von
5 ungefähr 1°C eintritt.

In einer weiteren besonders bevorzugten Variante umfasst das künstliche Plasmid die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 16 oder SEQ ID NO: 17, worin jeweils zwei Nucleotide gegenüber der Wildtyp-Sequenz aus-
10 getauscht sind. Besonders überraschend wurde dabei gefunden, dass durch den Ersatz der zwei Nucleotide eine Reduktion der Schmelztemperatur der Gattungsspezifischen Hybridisierungssonden von ungefähr 14,5°C eintritt. Dies erlaubt vorteilhafter Weise
15 den gleichzeitigen Einsatz der modifizierten 16S-rRNA zusammen mit der nachzuweisenden Wildtyp-16S-rRNA in einem Ansatz zur Schmelzkurvenanalyse, insbesondere mittels des erfindungsgemäßen Gattungsspezifischen Hybridisierungssonden-Paars, da ihre
20 Schmelztemperaturen unterscheidbar weit auseinanderliegen und somit das nachzuweisende Wildtyp-16S-rRNA-Fragment unbeeinflusst vom internen Standard detektiert und erkannt werden kann.

In diesem Zusammenhang ist ein weiterer Gegenstand
25 der vorliegenden Erfindung ein Diagnose-Kit zum spezifischen Nachweis einer Mycobakterien-Infektion und von *M. tuberculosis* und *M. avium* in klinischem Material gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren, das mindestens eine Polymerase, mindestens eines, vor-
30 zugsweise alle der vorgenannten Primerpaare und mindestens eines, vorzugsweise alle der vorgenannten Hybridisierungssonden-Paare umfasst. Erfin-

dungsgemäß bevorzugt umfasst das Diagnosekit zusätzlich mindestens ein erfindungsgemäßes künstliches Kontrollplasmid als internen Standard.

5 Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Referenzliste:

- 10 1. Bange, F. C., B. A. Brown, C. Smaczny, R. J. Wallace Jr, and E. C. Bottger. 2001. Lack of Transmission of Mycobacterium abscessus among Patients with Cystic Fibrosis Attending a Single Clinic. Clin.Infect.Dis. 32:1648-1650.
- 15 2. Chapin, K. and T. L. Lauderdale. 1997. Evaluation of a rapid air thermal cyclor for detection of Mycobacterium tuberculosis. J.Clin.Microbiol. 35:2157-2159.
- 20 3. Desjardin, L. E., Y. Chen, M. D. Perkins, L. Teixeira, M. D. Cave, and K. D. Eisenach. 1998. Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. J.Clin.Microbiol. 36:1964-1968.
4. Holland, S. M. 2001. Nontuberculous mycobacteria. Am.J.Med.Sci. 321:49-55.
- 25 5. Kirschner, P., J. Rosenau, B. Springer, K. Teschner, K. Feldmann, and E. C. Bottger. 1996. Diagnosis of mycobacterial infections by nucleic acid amplification: 18-month prospective study. J.Clin.Microbiol. 34:304-312.

- 5 6. Kirschner, P., B. Springer, U. Vogel, A. Meier, A. Wrede, M. Kiekenbeck, F. C. Bange, and E. C. Bottger. 1993. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J.Clin.Microbiol. 31:2882-2889.
- 10 7. Lindbrathen, A., P. Gaustad, B. Hovig, and T. Tonjum. 1997. Direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples from patients in Norway by ligase chain reaction. J.Clin.Microbiol. 35:3248-3253.
- 15 8. McKinney, J. D., W. R. Jacobs, and B. R. Bloom. 1998. Persisting problems in tuberculosis, p. 51-139. In R. M. Krause (ed.), Emerging Infections. Academic Press, London.
- 20 9. Nivin, B., P. Nicholas, M. Gayer, T. R. Frieden, and P. I. Fujiwara. 1998. A continuing outbreak of multidrug-resistant tuberculosis, with transmission in a hospital nursery. Clin.Infect.Dis. 26:303-307.
10. Pfyffer, G. E. 1999. Nucleic acid amplification for mycobacterial diagnosis. J.Infect. 39 :21-26.
- 25 11. Taylor, M. J., M. S. Hughes, R. A. Skuce, and S. D. Neill. 2001. Detection of Mycobacterium bovis in Bovine Clinical Specimens Using Real-Time Fluorescence and Fluorescence Resonance Energy Transfer Probe Rapid-Cycle PCR. J.Clin.Microbiol. 39:1272-1278.

12. Tevere, V. J., P. L. Hewitt, A. Dare, P. Hocknell, A. Keen, J. P. Spadaro, and K. K. Young. 1996. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR amplification with pan- *Mycobacterium* primers and hybridization to an *M. tuberculosis*-specific probe. *J.Clin.Microbiol.* 34:918-923.
13. Torres, M. J., A. Criado, J. C. Palomares, and J. Aznar. 2000. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* 38:3194-3199.
14. World Health Organization. 2000. Drug-resistant strains of TB increasing worldwide (PR WHO/19; <http://www.who.int>).
15. Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Bottger, and T. Bodmer. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J.Clin.Microbiol.* 31:175-178.
16. Torrens, J. K., P. Dawkins, S. P. Conway, and E. Moya. 1998. Non-tuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Thorax* 53:182-185.

Die Erfindung wird anhand des Sequenzprotokolls, das die Sequenzen Nr. 1 bis 17 enthält, anhand der Figuren 1 bis 4 sowie anhand der Beispiele 1 bis 8 näher erläutert.

SEQ ID NO: 1 - "sense"-Primer („forward“-Primer)
des Primer-Paares zur Amplifikation eines 1000 bp-
Fragments des 16S-rRNA-Gens vom Mykobakterien, ent-
haltend die Art-spezifische Regionen des *M. tuber-*
5 *culosis*-Komplex und von *M. avium* und die Gattungs-
spezifische Region III der Gattung *Mycobacterium*,

SEQ ID NO: 2 - "sense"-Primer („forward“-Primer)
des Primer-Paares zur Amplifikation eines 300 bp-
Fragments des 16S-rRNA-Gens vom Mykobakterien, ent-
10 haltend die Art-spezifische Regionen des *M. tuber-*
culosis-Komplex und von *M. avium*,

SEQ ID NO: 3 - "antisense"-Primer („reverse“-
Primer) des Primer-Paares zur Amplifikation eines
300 bp-Fragments des 16S-rRNA-Gens vom Mykobakte-
15 rien, enthaltend die Art-spezifische Regionen des
M. tuberculosis-Komplex und von *M. avium*,

SEQ ID NO: 4 - "sense"-Primer („forward“-Primer)
des Primer-Paares zur Amplifikation eines 100 bp-
Fragments des 16S-rRNA-Gens vom Mykobakterien, ent-
20 haltend die Gattung-spezifische Region III der
Gattung *Mycobacterium*,

SEQ ID NO: 5 - "antisense"-Primer („reverse“-
Primer) a) des Primer-Paares zur Amplifikation ei-
nes 1000 bp-Fragments des 16S-rRNA-Gens vom Myko-
25 bakterien, enthaltend die Art-spezifische Regionen
des *M. tuberculosis*-Komplex und von *M. avium* und
die Gattung-spezifische Region III der Gattung *My-*
cobacterium, und b) des Primer-Paares zur Amplifi-
kation eines 100 bp-Fragments des 16S-rRNA-Gens vom

Mykobakterien, enthaltend die Gattungs-spezifische Region III der Gattung *Mycobacterium*,

5 SEQ ID NO: 6 - "antisense"-Hybridisierungssonde, insbesondere Donor-Komponente, des Sondenpaars zur Detektion der Art-spezifischen Region des *M. tuberculosis*-Komplex,

10 SEQ ID NO: 7 - "sense"-Hybridisierungssonde, insbesondere Akzeptor-Komponente, des Sondenpaars zur Detektion der Art-spezifischen Region des *M. tuberculosis*-Komplex,

SEQ ID NO: 8 - "antisense"-Hybridisierungssonde, insbesondere Donor-Komponente, des Sondenpaars zur Detektion der Art-spezifischen Region von *M. avium*,

15 SEQ ID NO: 9 - "sense"-Hybridisierungssonde, insbesondere Akzeptor-Komponente, des Sondenpaars zur Detektion der Art-spezifischen Region von *M. avium*,

20 SEQ ID NO: 10 - "antisense"-Hybridisierungssonde, insbesondere Donor-Komponente, des Sondenpaars zur Detektion der Gattungs-spezifischen Region III der Gattung *Mycobacterium*,

SEQ ID NO: 11 - "sense"-Hybridisierungssonde, insbesondere Akzeptor-Komponente, des Sondenpaars zur Detektion der Gattungs-spezifischen Region III der Gattung *Mycobacterium*,

25 SEQ ID NO: 12 - "sense"-Primer („forward“-Primer) des Primer-Paares zur Amplifikation des kompletten 16S-rRNA-Gens (1523 bp) von Mykobakterien,

- SEQ ID NO: 13 - "antisense"-Primer („reverse“-Primer) des Primer-Paares zur Amplifikation zur Amplifikation des kompletten 16S-rRNA-Gens (1523 bp) von Mykobakterien,
- 5 SEQ ID NO: 14 - modifizierter "sense"-Primer („forward“-Primer) zur Amplifikation eines kompletten Kontrollplasmids, enthaltend eine-modifizierte Gattungs-spezifische Region III des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien,
- 10 SEQ ID NO: 15 - modifizierter "antisense"-Primer („reverse“-Primer) zur Amplifikation eines kompletten Kontrollplasmids, enthaltend eine modifizierte Gattungs-spezifische Region III des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien,
- 15 SEQ ID NO: 16 - modifizierter "sense"-Primer („forward“-Primer) zur Amplifikation eines weiteren kompletten Kontrollplasmids, enthaltend eine weitere modifizierte Gattungs-spezifische Region III des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien,
- 20 SEQ ID NO: 17 - modifizierter "antisense"-Primer („reverse“-Primer) zur Amplifikation eines weiteren kompletten Kontrollplasmids, enthaltend eine weitere modifizierte Gattungs-spezifische Region III des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien.
- 25 Die Erfindung wird anhand der folgenden Ausführungsbeispiele und den dazugehörigen Figuren näher erläutert:

Die Figuren zeigen:

- Figur 1: Schematische Darstellung des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien (Länge: 1523 bp), der Position der Art-spezifischen Regionen, „species(A)“ und „species(B)“, sowie der Gattungsspezifischen Regionen „genus I“, „genus II“ und „genus III“, sowie der Lage und Größe der mittels der Primer-Paare (1) und (5), (2) und (3) sowie (4) und (5) amplifizierten Fragmente.
- Figur 2: Sensitivität des Art-spezifischen Nachweises des *M. tuberculosis*-Komplexes: Schmelzkurven der Hybridisierung der erfindungsgemäßen Art-spezifischen Hybridisierungs sonden mit der Art-spezifischen Region des *M. tuberculosis*-Komplexes im amplifizierten 1000 bp-Fragment der 16S-rRNA von Mykobakterien.
- Figur 3: Modifiziertes 16S-rRNA-Fragment als interner Standard (pJL6): Schmelzkurven der Hybridisierung der Gattungsspezifischen Hybrid Schmelzkurven der Hybridisierung isierungs sonden mit der Gattungsspezifischen Region III und der modifizierten Gattungsspezifischen Region III des internen Standards (pJL6) bei unterschiedlicher Anzahl an Genomkopien der nachzuweisenden Gattungsspezifischen Region III.

Figur 4: Modifiziertes 16S-rRNA-Fragment als interner Standard (pJL6): Schmelzkurven der Hybridisierung der Gattungsspezifischen Hybridisierungssonden mit der Gattungsspezifischen Region III und der modifizierten Gattungsspezifischen Region III des internen Standards (pJL6) in Gegenwart unterschiedlicher Menge an „Hintergrund“-DNA aus *E. coli*.

Beispiel 1:

a) DNA-Isolierung aus klinischem Material

Mikrobielle DNA wird aus klinischen Proben bestehend aus Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Liquor, Knochenmark, Blut oder Punktat-Biopsien in an sich bekannter Weise zum Beispiel mittels eines QiaampMiniKit (Firma Qiagen, Katalog-Nr. 51306) aufgereinigt, das heißt extrahiert. Chromosomale DNA wird dabei mittels PicoGreen-System (Firma Molecular Probes) quantifiziert.

Verschiedene Anzahlen genomischer Kopien pro Nachweis-Ansatz (siehe unten) werden durch Molekulargewichtsberechnungen und die Durchführung von Verdünnungsreihen erhalten.

a') DNA-Isolierung aus Kulturoislaten

Insbesondere zur Evaluation der erfindungsgemäßen Nachweisverfahren wird mikrobielle DNA verschiedener Kulturen von Mikroorganismen, zum Beispiel der in Tabelle 1 aufgeführten Organismen, isoliert.

Insbesondere zur Anwendung der erfindungsgemäßen Nachweisverfahren auf aus Patienten-Proben gewonnenen (Bouillon-)Kulturen von zu diagnostizierenden Mikroorganismen wird mikrobielle DNA aus diesen Kulturen isoliert.

Anschließend wird die mikrobielle DNA in an sich bekannter Weise—zum Beispiel mittels eines QiaampMiniKit™ (Firma Qiagen, Katalog-Nr. 51306) aufgereinigt, das heißt extrahiert. Chromosomale DNA wird dabei in an sich bekannter Weise zum Beispiel mittels PicoGreen™-System (Firma Molecular Probes) quantifiziert.

b) PCR-Amplifikation

Zur Amplifikation in einer optimierten LightCycler™-PCR (siehe Beispiel 3) wird ein Ansatz beinhaltend die fertig erhältliche Mischung „LightCycler FastStart DNA Master Hybridisation Probes“ (Katalog-Nr. 239272, Firma Roche Molecular Biochemicals) gewählt.

Es wird folgende Reaktionsmischung für die LightCycler-Reaktion hergestellt:

- Taq Polymerase
- Reaktionspuffer
- Desoxi-Nucleosid-Triphosphat-Mischung (dNTP)
- 3 mM MgCl₂
- Primer-Paar a) oder b)
je Primer: 18 pmol, entsprechend 1,1 µM Endkonzentration:

a) Primer-Paar SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 5

oder

b) Primer-Paar SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 3

und Primer-Paar SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 5

5 Erfindungsgemäß wird zur Amplifikation das
Primer-Paar a) SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 5 ein-
gesetzt, das ein 1000 bp langes Fragment der
16S-rRNA, enthaltend die Gattungs-spezifische
Region III und die Art-spezifischen Regionen,
10 amplifiziert.

Alternativ werden erfindungsgemäß die beiden
Primer-Paare b) gleichzeitig in einem Mu-
ltilplex-PCR-Ansatz, in parallelen Ansätzen
oder zeitlich getrennt eingesetzt, wobei das
15 Primer-Paar enthaltend SEQ ID NO: 2/SEQ ID
NO: 3 ein 300 bp langes Fragment der 16S-rRNA,
enthaltend die Art-spezifischen Regionen,
amplifiziert und zum anschließenden Nachweis
des *M. tuberculosis*-Komplex und/oder von *M.*
20 *avium* dient, und wobei das Primer-Paar enthal-
tend SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 5 ein 100 bp lan-
ges Fragment der 16S-rRNA, enthaltend die Gat-
tungs-spezifische Region III, amplifiziert und
zum anschließenden Nachweis einer Mykobakte-
25 rien-Infektion dient.

- Oligonucleotid-FRET-Sonden-Paare c) bis e)
je Sonde: 2 pmol, entsprechend 120 nM Endkon-
zentration:

30 c) SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 11 zur Detektion
der Gattungs-spezifischen Region III,

d) SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 7 zur Detektion der Art-spezifischen Region des *M. tuberculosis*-Komplex,

5 e) SEQ ID NO: 8/SEQ ID NO: 9 zur Detektion der Art-spezifischen Region von *M. avium*

10 Erfindungsgemäß wird das Sondenpaar c) SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 11 oder ein komplementäres oder mutiertes oder degeneriertes Paar davon zur Detektion der Gattungs-spezifischen Region III eingesetzt. Soll im erfindungsgemäßen Verfahren lediglich zusätzlich zu der Gattungsspezifischen Detektion der *M. tuberculosis*-Komplex detektiert werden, wird das Sondenpaar

15 d) SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 7 beziehungsweise deren Äquivalente, das heißt mutierte oder komplementäre Paare davon, eingesetzt. Sollen dagegen zusätzlich zur Gattungsspezifischen Detektion lediglich Mykobakterien der Art *M. avium* nachgewiesen werden, wird das Sondenpaar

20 e) SEQ ID NO: 8/SEQ ID NO: 9 beziehungsweise deren Äquivalente, das heißt mutierte oder komplementäre Paare davon, eingesetzt. Sollen gemeinsam mit der Gattungsspezifischen Region III sowohl der *M. tuberculosis*-Komplex also

25 auch *M. avium* nachgewiesen werden, werden neben dem Sondenpaar c) entsprechend beide Sondenpaare d) und e) eingesetzt.

30 Diese Reaktionsmischung wird durch Puls-Zentrifugation in die Glaskapillaren des LightCycler-Systems verbracht und die Amplifikation nach dem „Hot Start“-Prinzip nach einer anfänglichen De-

naturierung bei 95°C für 10 Minuten mit den folgenden Schritten durchgeführt:

1. Denaturierung bei 95°C für 3 Sekunden
2. Primer-Hybridisierung bei Temperaturen von
5 68°C bis 62°C für 2 Sekunden („touch-down-annealing“)
3. Polymerisation bei 72°C für 40 Sekunden.

Die Schritte 1 bis 3 werden insgesamt 50 mal zyklisch abgearbeitet, wobei für die ersten 5 Zyklen
10 die Hybridisierung in Schritt 2 bei 68°C erfolgt und bei den nachfolgenden 6 Zyklen die Temperatur auf 62°C in Schritten von 1°C pro Zyklus reduziert wird und für die restlichen Zyklen bei 62°C durchgeführt wird. Die Rate der Temperaturänderung liegt
15 bei allen Schritten bei 20°C pro Sekunde.

c) Detektion und Schmelzkurvenanalyse:

Zur Detektion der amplifizierten Fragmente werden die in der Reaktionsmischung eingesetzten FRET-markierten Hybridisierungssonden-Paare verwendet,
20 wobei jeweils ein Hybridisierungssonden-Partner (SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 6 beziehungsweise SEQ ID NO: 8) als Donor-Komponente am 3'-terminalen Nucleotid mit Fluorescein assoziiert ist, und der jeweils andere Hybridisationssonden-Partner (SEQ ID
25 NO: 11, SEQ ID NO: 7 beziehungsweise SEQ ID NO: 9) als Akzeptor-Komponente am 5'-terminalen Nucleotid mit LightCycler-Green 640 assoziiert ist.

Die im Verlauf der Detektion erfolgende Schmelzkurvenanalyse beginnt mit der Denaturierung der ampli-

fizierten Fragmente bei 95°C für 30 Sekunden, worauf eine Hybridisierung mit den vorgenannten FRET-Paaren bei 38°C für 30 Sekunden folgt. Zur Bestimmung der Schmelzkurve der Hybridisierung wird die Temperatur anschließend kontinuierlich von 38°C auf 80°C mit einer Rate von 0,2°C/sec erhöht, wobei die von den FRET-Paaren emittierte Fluoreszenz kontinuierlich aufgezeichnet wird. Zur Auswertung des Fluoreszenzsignals wird das LightCycler-„Run Profile“-Programm in der Version 3.5.3 eingesetzt, wobei die Verstärkung des F2-Kanals des photometrischen Detektors des LightCycler-Systems automatisch eingestellt wird.

15 Beispiel 2: Künstliches Plasmid als interner Standard

a) Bereitstellung eines Kontrollplasmids (erfindungsgemäß)

20 Um einen internen Standard zur Kontrolle der erfolgreichen selektiven Amplifikation der gewünschten Fragmente des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien gemäß Beispiel 1 zur Verfügung zu haben (Inhibitionskontrolle), wird zunächst das gesamte 16S-rRNA-Gen von Mykobakterien (1523 bp) mit einem PCR-Primerpaar amplifiziert, wobei der „sense“-Primer aus der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 12 und der „antisense“-Primer aus der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 13 besteht. Zur Amplifikation werden 40 Zyklen der folgenden Schritte durchgeführt:

1. Denaturierung bei 95°C
2. Primer-Hybridisierung bei 56,5°C
3. Polymerisation bei 72°C.

5 Anschließend werden die amplifizierten Fragmente in
an sich bekannter Weise zum Beispiel in pGEM-T
(Firma Promega) subcloniert.

10 Um das künstliche Plasmid als internen Standard
einsetzen zu können, soll sich die im künstlichen
Plasmid (=pIJ6) enthaltene Gattungs-spezifische Re-
gion III der 16S-rRNA durch mindestens eine Punkt-
mutation von der Wildtyp-Nucleotidsequenz der Gat-
tungs-spezifischen Region III unterscheiden. Um
mindestens eine gezielte Punktmutation in die Gat-
tungs-spezifische Region III des 16S-rRNA-Fragments
15 einzuführen, werden zur Vervielfältigung der die
subclonierten Fragmente enthaltenden Plasmide modi-
fizierte Primerpaare eingesetzt, bei denen jeweils
ein oder zwei Nucleotide in den Nucleotidsequenzen
gegenüber den Wildtyp-Nucleotidsequenzen aus-
20 getauscht wurden.

Dazu werden folgende Primerpaare, abgeleitet von
der Wildtyp-Sequenz der Gattungs-spezifischen Regi-
on III, insbesondere von der die Akzeptor-
Komponente des erfindungsgemäßen FRET-Paars, SEQ ID
25 NO: 11, bindenden Region verwendet:

a) Austausch eines Nucleotids:

„forward“-Primer: (SEQ ID NO: 14)

5' - GGC TTG ACA TGC ACA GGA CGC -3'

„reverse“-Primer: (SEQ ID NO: 15)

5' - GCG TCC TGT GCA TGT CAA GCC -3'

b) Austausch von zwei Nucleotiden:

„forward“-Primer: (SEQ ID NO: 16)

5' - GGT TTG ACA TAC ACT GGA CGC -3'

5 „reverse“-Primer: (SEQ ID NO: 17)

5' - GCG TCC AGT GTA TGT CAA ACC -3'

10 In den erfindungsgemäßen Nucleotidsequenzen der vorgenannten modifizierten Primerpaare wurde jeweils das unterstrichene Nucleotid gegenüber der Wildtyp-Sequenz der Gattungs-spezifischen Region III ersetzt.

15 Die Vervielfachung der Kontrollplasmide mit den modifizierten Primerpaaren wird jeweils in einer „long range“-PCR mit einer *Pfu*-Polymerase, Typ: „*Pfu* Turbo Hot Start DNA“ (Firma Stratagene) in an sich bekannter Weise in einem „Hot Start“ PCR-Verfahren durchgeführt mit jeweils 18 Zyklen der folgenden Schritte:

- 20
1. Denaturierung bei 95°C
 2. Primer-Hybridisierung bei 50°C
 3. Polymerisation bei 68°C.

Ergebnisse:

25 a) Die erhaltenen Amplicons werden zusätzlich über ein Gel aufgereinigt und die Punktmutationen können anschließend werden mittels Sequenzierung bestätigt werden.

b) Der Ersatz des Nucleotids 'T' mit dem Nucleotid 'C' am 3'-Ende der die Akzeptor-Komponente des

FRET-Paars bindenden Region der Gattungsspezifischen Region III führt zu einer Reduktion der Schmelztemperatur von ungefähr 1°C.

5 c) Wird am 5'-Ende das Nucleotid 'G' mit dem Nucleotid 'A' und vier Nucleotide entfernt davon das Nucleotid 'A' mit dem Nucleotid 'T' ersetzt, kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Schmelztemperatur um cirka 14,5°C.

10 Als besonders überraschend wird gefunden, dass eine zwei Nucleotide umfassende Modifikation der die Akzeptor-Komponente des FRET-Paars bindenden Region der Gattungsspezifischen Region III ausreicht, um eine Differenzierung der so modifizierten 16S-rRNA, enthalten in einem künstlichen Plasmid, von der
15 Wildtyp-16S-rRNA zu unterscheiden. Die Verwendung des erfindungsgemäßen modifizierten 16S-rRNA-Fragments als interner Standard, enthalten in einem künstlichen Plasmid, im erfindungsgemäßen Verfahren gemäß Beispiel 1 ist somit besonders vorteilhaft
20 zur Kontrolle der Amplifikation und zur Verifikation des Nachweises einer Mykobakterien-Infektion.

b) Zweckmäßigkeit des Kontrollplasmids bei geringer Menge von Proben-Genom

25 In einem weiteren Experiment wird zunächst, wie unter a) beschrieben, durch Einsatz der erfindungsgemäßen Primer SEQ ID NO: 16 und SEQ ID NO: 17 ein Kontrollplasmid erhalten, das ein durch Austausch zweier Nukleotide modifiziertes 16S-rRNA-Fragment enthält. Jeweils 50 Kopien des Kontrollplasmids
30 werden als interner Standard mit verschiedenen An-

zahlen von Genkopien des 16S-rRNA-Gens von *M. tuberculosis* gemischt und dem Nachweisverfahren gemäß Beispiel 1 unterzogen.

Ergebnis:

- 5 In Gegenwart von 50 Kopien des internen Standards konnten bereits 10 Genkopien des 16S-rRNA-Fragments von *M. tuberculosis* eindeutig mittels Schmelzkurvenanalyse nachgewiesen werden. Bei einer Anzahl von 5 Genkopien ist das dabei erhaltene Fluoreszenzsignal zwar nicht mit einfachen statistischen Mitteln auswertbar, jedoch lässt sich in der Schmelzkurvenschar in Figur 3 eine deutliche Spitze bei der entsprechenden Schmelztemperatur nachweisen.
- 10
- 15 Die Verwendung dieses internen Standards ist somit auch dann möglich, wenn zu erwarten ist, dass die Anzahl an nachzuweisenden Genkopien im klinischen Material um eine Größenordnung geringer ist als die Zahl der als interner Standard eingesetzten Plasmidkopien.
- 20

c) Zweckmäßigkeit des Kontrollplasmids in Gegenwart von „Hintergrund“-DNA

- In einem weiteren Experiment wird zunächst, wie unter a) beschrieben, durch Einsatz der erfindungsgemäßen Primer SEQ ID NO: 16 und SEQ ID NO: 17 ein Kontrollplasmid (erhalten, das ein durch Austausch zweier Nukleotide modifiziertes 16S-rRNA-Fragment enthält. Jeweils 50 Kopien des Kontrollplasmids und 10 Genkopien des 16S-rRNA-Gens von *M. tuberculosis* werden mit unterschiedlichen Mengen an „Hinter-
- 25
- 30

grund"-DNA von *E. coli* im Bereich von 1 pg bis 200 ng versetzt und anschließend dem Nachweisverfahren gemäß Beispiel 1 unterzogen.

Ergebnis:

- 5 In Gegenwart von bis zu 200 ng fremder DNA, sogenannter „Hintergrund“-DNA, pro Ansatz konnten 10 Genkopien des 16S-rRNA-Fragments von *M. tuberculosis* noch eindeutig mittels Schmelzkurvenanalyse nachgewiesen werden (Figur 4).
- 10 Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren, insbesondere unter Verwendung dieses internen Standards, ist somit auch dann möglich, wenn zu erwarten ist, dass im isolierten klinischen Material eine große Menge an fremder DNA, Hintergrund-DNA, vorhanden ist.
- 15 Beispiel 3: Beurteilung der Leistungsfähigkeit des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens auf dem LightCycler™-System
- 20 Zur Untersuchung der auf dem LightCycler™-System basierten Amplifikation und Hybridisierung (siehe Beispiel 1) wird als „Template“ genomische DNA des Bakterienstammes *Mycobacterium bovis* BCG des *M. tuberculosis*-Komplex verwendet.
- 25 Verschiedene Anzahlen genomischer Kopien pro PCR-Reaktion werden durch Molekulargewichtsberechnungen und die Durchführung von Verdünnungsreihen erhalten.

Folgende Parameter wurden für die kombinierte Amplifikations- und Hybridisierungsreaktion eingesetzt:

- MgCl_2 -Konzentration 3 mM
- 5 - Primer-Konzentration: 18 pmol pro Reaktion, entspricht einer Endkonzentration von 1,1 μM
- „Hot Start“-Taq Polymerase des Typs „LightCycler™ FastStart DNA Master SYBR Green I“ (Katalog-Nr. 3003230)
- 10 - Polymerisationszeit: 40 Sekunden
- Hybridisierungs-Zeit: 3 Sekunden
- Hybridisierungs-Temperatur: 62°C, bei schrittweiser Reduzierung ausgehend von 68°C nach 5 Zyklen mit 1°C pro Zyklus.

15 Ergebnisse:

Eine Zahl von 5 Genomkopien kann reproduzierbar in Verdünnungsreihen nachgewiesen werden.

20 Sowohl der Einsatz einer „Hot Start“-Polymerase als auch die zyklusweise Reduktion der Hybridisierungstemperatur verhindert die Bildung von Primer-Dimeren und erhöht die Sensitivität der Amplifikation.

25 Beispiel 4: Spezifische Amplifikation von 16S-rRNA-Fragmenten von Mykobakterien (erfindungsgemäß)

In einem ersten Ansatz gemäß Beispiel 1 wird mit den entsprechenden erfindungsgemäßen Primerpaaren ein jeweils 100 bp langes Fragment der Gattungs-

spezifischen Region III (SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 5) und ein 300 bp langes Fragment der Art-spezifischen Regionen (SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 3) amplifiziert.

5 In einem zweiten Ansatz gemäß Beispiel 1 wird ein 1000 bp langes Fragment, das sowohl die Gattungsspezifische Region III als auch die beiden Art-spezifischen Regionen enthält, mit dem entsprechenden Primerpaar (SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 5) amplifiziert.

10 Anschließend wird die Sensitivität des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens gemäß Beispiel 1 getestet.

Ergebnis:

15 Überraschenderweise ergibt sich, dass das 1000 bp lange Fragment gegenüber den beiden 100 bp und 300 bp langen Fragmenten dieselbe Sensitivität des Nachweises besitzt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem Vorurteil aus dem Stand der Technik, wonach es aufgrund des hohen CG-Nucleotidgehalts im 20 16S-rRNA-Gen von Mykobakterien zu unspezifischen Störungen bei dem Nachweisverfahren gemäß Beispiel 1 in einem LightCyclerTM-System kommt.

25 Beispiel 5: Sensitivität des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens

Zur Überprüfung der Sensitivität wird im erfindungsgemäßen Nachweisverfahren (Beispiel 1) das mit dem Primer-Paar SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 5 amplifizierte 1000 bp-Fragment eingesetzt.

a) Sensitivität des Nachweises der Gattungsspezifischen Region III

Zunächst wird eine Verdünnungsreihe des Genoms von *M. bovis* BCG aus dem *M. tuberculosis*-Komplex wird
5 erstellt, die jeweils 5, 50, 500 beziehungsweise 5000 Genomkopien enthält.

In weiteren Ansätzen werden Verdünnungsreihen weiterer tuberkulöser und nicht-tuberkulöser Mykobakterienarten untersucht.

10 Ergebnisse:

a) Bereits bei 5 Genomkopien lässt sich eindeutig eine Schmelzkurve bestimmen, wobei der Schmelzpunkt der Gattungsspezifischen Region III für alle Mykobakterienarten bei mindestens 55°C liegt. Bei *M.*
15 *chelonae* liegt der Schmelzpunkt bei 55°C, bei allen anderen Mykobakterienarten bei 61,5°C.

b) Darüber hinaus zeigt sich, dass bei einer Vielzahl anderer Mykobakterienarten, beispielsweise von *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum*,
20 *M. abscessus*, *M. fortuitum*, ein eindeutiger Nachweis der Gattungsspezifischen Region III bei einer Zahl von 5 Genomkopien erfolgen kann.

b) Sensitivität des Nachweises von *M. tuberculosis*

25 Gemäß a) wird eine Verdünnungsreihe des *M. tuberculosis*-Genoms erstellt, die jeweils 5, 50, 500 beziehungsweise 5000 Kopien enthält.

Ergebnis:

Bereits bei 5 Genomkopien kann die Schmelzkurve der Art-spezifischen Region von *M. tuberculosis* eindeutig bestimmt werden (Figur 2). Dabei liegt der ermittelte Schmelzpunkt bei 64°C (Tabelle 1).

c) Sensitivität des Nachweises von *M. avium*

Entsprechend a) und b) wird eine Verdünnungsreihe des Genoms von *M. avium* angefertigt und mit den entsprechenden Hybridisierungssonden-Paaren eine Schmelzkurvenanalyse der amplifizierten Fragmente durchgeführt.

Ergebnis:

Bereits ausgehend von 5 Genomkopien ist eine Schmelzkurvenanalyse des Amplicons möglich, wobei ein Schmelzpunkt von 61,0°C festgestellt wird (Tabelle 1).

Beispiel 6: Spezifität des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens

a) Spezifität der Amplifikations-Primer

Aus den Mikroorganismen aus Tabelle 1 wird pro Ansatz jeweils 2,5 ng genomische DNA, entsprechend 500000 Genomkopien, extrahiert und in das erfindungsgemäße Nachweisverfahren eingesetzt.

Wie in Beispiel 5 wird dabei mit dem Gattungsspezifischen Primerpaar SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 5 ein 1000 bp langes Fragment des 16S-rRNA-Gens amplifiziert.

Ergebnisse:

a) Bei sämtlichen untersuchten Mykobakterienarten findet Amplifikation statt.

5 b) Das eingesetzte Primer-Paar zeigt eine fast vollständige Gattungs-Spezifität für Mykobakterien: Ausgewählt aus der Vielzahl verschiedener bakterieller und pilzlicher Mikroorganismen findet lediglich bei der Gattung *Corynebakterium* eine Amplifikation des 16S-rRNA-Gens statt.

10 b) Spezifität des Gattungs-spezifischen Nachweises

Eine Schmelzkurvenanalyse der in amplifizierten Fragmente mittels des erfindungsgemäßen Hybridisierungssonden-Paars SEQ ID NO: 10 /SEQ ID NO: 11, spezifisch für die Gattungs-spezifische Region III, wird durchgeführt.

Ergebnisse (Tabelle 1):

a) Sämtliche Mykobakterienarten weisen einen Schmelzpunkt von mindestens 55°C auf.

20 b) Bei *M. chelonae* liegt der Schmelzpunkt bei 55°C, bei allen anderen Mykobakterienarten bei 61,5°C.

c) Der Schmelzpunkt bei amplifizierten 16S-rRNA-Fragmenten der Gattung *Corynebakterium* liegt bei 43°C, beziehungsweise es kann überhaupt kein Hybridisierungssignal detektiert werden.

25 d) Mittels des erfindungsgemäßen Gattungsspezifischen Nachweisverfahrens lassen sich sämtliche Mykobakterienarten eindeutig gegenüber anderen Mikroorganismen identifizieren.

c) Spezifität des Nachweises des *M. tuberculosis*-Komplex

Entsprechend a) werden zunächst jeweils 2,5 ng genomischer DNA der in Tabelle 1 aufgelisteten Mikroorganismen eingesetzt und jeweils ein 1000 bp langes Fragment amplifiziert.

Anschließend wird mit dem Art-spezifischen Hybridisierungssonden-Paar SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 7 eine Schmelzkurvenanalyse der Amplicons durchgeführt.

10 Ergebnis:

Während die Schmelztemperatur bei den Arten des *M. tuberculosis*-Komplex bei einheitlich 64°C liegt, beträgt die Schmelztemperatur für alle nicht-tuberkulösen Erreger zwischen 43,5°C und 54°C, falls überhaupt ein Hybridisierungssignal detektiert werden kann (Tabelle 1).

Mittels des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens lassen sich tuberkulöse Erreger gegenüber allen anderen nicht-tuberkulösen Erregern selektiv nachweisen.

20

d) Spezifität des Nachweises des *M. avium*

Entsprechend a) werden zunächst jeweils 2,5 ng genomischer DNA der in Tabelle 1 aufgelisteten Mikroorganismen eingesetzt und jeweils ein 1000 bp langes Fragment amplifiziert.

25

Anschließend wird mit dem Art-spezifischen Hybridisierungssonden-Paar SEQ ID NO: 8/SEQ ID NO: 9 eine Schmelzkurvenanalyse der Amplicons durchgeführt.

Ergebnis:

Während die Schmelztemperatur bei *M. avium* bei einheitlich 61°C liegt, beträgt die Schmelztemperatur für alle anderen Erreger zwischen 43°C und 54°C, falls überhaupt ein Hybridisierungssignal detektiert werden kann (Tabelle 1).

Mittels -des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens lässt sich der nicht-tuberkulöse Erreger *M. avium* gegenüber allen anderen Erregern selektiv nachweisen.

Beispiel 7: Vergleichsbeispiel zur Spezifität des Gattungsspezifischen Nachweises mittels der Gattungsspezifischen Region II („genus II“)

Im Gegensatz zum vorstehenden erfindungsgemäßen Beispiel 6 b) werden zur Schmelzkurvenanalyse des gemäß 6 a) amplifizierten 1000 bp-Fragments des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien aus Tabelle 1 die aus dem Stand der Technik bekannten Hybridisierungssonden verwendet, die für die Gattungsspezifische Region II selektiv sind (siehe Figur 1: „genus II“).

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse dargestellt: Während ein Großteil der untersuchten Mykobakterienarten einen Schmelzpunkt von 60,5°C besitzt, ist bei den Mykobakterienarten *M. triviale*, *M. chitae*, *M. xenopi* und *M. agri* der Schmelzpunkt gegenüber den anderen Mykobakterienarten erniedrigt (Tabelle 1). Außerdem werden auch

bei der Gattung *Cornyebakterium* Amplifikate detektiert.

Die gefundenen Schmelzpunkte von *M. triviale*, *M. chitae*, *M. xenopi*, *M. agri* und allen anderen Mykobakterienarten lassen sich statistisch nicht von den gefundenen Schmelzpunkten der *Cornyebakterium*-Arten trennen. Ein eindeutiger Nachweis einer Mykobakterien-Infektion gegenüber zum Beispiel einer Infektion mit *Cornyebakterien* ist mittels der Gattungsspezifischen Region II nicht möglich.

Beispiel 8: Quantitative Bestimmung des Gehalts an Mykobakterien in klinischen Proben (erfindungsgemäß)

In dem erfindungsgemäß eingesetzten FRET-System ist unter bestimmten Bedingungen das Maß an Fluoreszenz in diesem Wellenlängenbereich eine Funktion der Menge an in der Probe vorhandenen und detektierten DNA. Durch das FRET-System sind quantitative Messungen der Menge amplifizierter DNA-Fragmente möglich, wenn die ausgewählten Hybridisierungs sonden quantitativ, also stöchiometrisch, an die amplifizierten Fragmente binden.

Zur Quantifizierung von „Target“-DNA, wird diese mit einer bekannten DNA-Konzentration eines Standards verglichen. Dazu eignet sich das klonierte 16S rRNA-Gen im pGEM-T oder auch das erfindungsgemäß einsetzbare Kontrollplasmid (pIJ6).

Die Fluoreszenz wird bei dieser Methode nach jedem der insgesamt 50 Amplifikationszyklen gemessen. Bei

einer hohen Konzentration des Standards erscheint ein Fluoreszenzsignal beispielsweise bereits nach 20 Zyklen. Eine niedrige Konzentration führt erst nach beispielsweise 35 Zyklen zu einem Signal.

- 5 Der Standard wird zum einen getrennt von den zu untersuchenden Proben gemessen, wobei wenigstens fünf verschiedene Konzentrationen verwendet werden, um eine Standardkurve zu erstellen. Wird das Plasmid pIJ6 verwendet, kann jeweils eine Konzentration des
10 Standards in jeder untersuchten Probe verwendet werden. Die Unterscheidung zwischen Standard und „Target-DNA“ erfolgt über den unterschiedlichen Schmelzpunkt. Der Standard dient insbesondere gleichzeitig als Kontrolle, dass die Amplifikation
15 nicht durch Störfaktoren inhibiert wurde (Inhibitionskontrolle).

- Zur Detektion der amplifizierten Fragmente werden die in der Reaktionsmischung eingesetzten FRET-markierten Hybridisierungssondenpaare verwendet.
20 Die Amplifikationsreaktion läuft wie in Beispiel 1, wobei nach jedem Amplifikationsschritt die Fluoreszenz gemessen wird. Die optimale „Annealing“-Temperatur liegt bei 62°C. Die Schmelzpunktanalyse wird unbeeinträchtigt nach Abschluss der Amplifikation
25 tionsreaktion wie in Beispiel 1 c) durchgeführt.

Tabelle 1:

Mikroorganismus	Schmelztemperatur bei Hybridisierungs sonden spezifisch für				
	erfindungsgemäß				Vergleich
	A*	Gattung III	Mycobacterium		Gattung II
			tuber- culosis	avium	
I. Mycobacterium tuberculosis Komplex					
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (ATCC 35712)	+	61,5°C	64°C	54°C	60,5°C
<i>M. bovis</i>	+	61,5°C	64°C	54°C	60,5°C
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur	+	61,5°C	64°C	54°C	60,5°C
II. nicht-tuberkulöse Mykobakterien					
<i>M. avium</i> (ATCC 35712)	+	61,5°C	43,5°C	61°C	60,5°C
<i>M. paratuberculosis</i>	+	61,5°C	43,5°C	61°C	60,5°C
<i>M. intracellulare</i>	+	61,5°C	-	51°C	60,5°C
<i>M. kansasii</i> (DSMZ 44162)	+	61,5°C	50°C	48°C	60,5°C
<i>M. gastri</i> (DSMZ 43505)	+	61,5°C	50°C	48°C	60,5°C
<i>M. abscessus</i> (ATCC 19977)	+	61,5°C	-	-	60,5°C
<i>M. chelonae</i> (ATCC 35752)	+	55°C	-	-	60,5°C
<i>M. celatum</i> (ATCC 58131)	+	61,5°C	-	44°	60,5°C
<i>M. farcinogenes</i> (ATCC 35753)	+	61,5°C	50°C	48°C	60,5°C
<i>M. hämophilum</i> (ATCC 29548)	+	61,5°C	50°C	48°C	60,5°C
<i>M. malmoense</i> (ATCC 27046)	+	61,5°C	-	43°C	60,5°C
<i>M. marinum</i> (ATCC 927)	+	61,5°C	45°C	48°C	60,5°C
<i>M. scrofulaceum</i> (ATCC 19981)	+	61,5°C	50°C	48°C	60,5°C
<i>M. shimoidei</i> (ATCC 27962)	+	61,5°C	50°C	48°C	60,5°C
<i>M. xenopi</i>	+	61,5°C	54°C	47°C	59°C
<i>M. simiae</i>	+	61,5°C	50°C	48°C	60,5°C
<i>M. agri</i> (ATCC 27406)	+	61,5°C	-	43°C	53°C
<i>M. triviale</i> (ATCC 23292)	+	61,5°C	48°C	49°C	53°C
<i>M. fortuitum</i>	+	61,5°C	45°C	47°C	60,5°C
<i>M. chitae</i> (ATCC 19627)	+	61,5°C	51°C	51°C	56,5°C
<i>M. duvalii</i> (ATCC 43910)	+	61,5°C	43°C	45°C	60,5°C
<i>M. neoaurum</i> (ATCC 25795)	+	61,5°C	48°C	53°C	60,5°C
<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	+	61,5°C	-	44°C	60,5°C
<i>M. rhodesiae</i> (ATCC 27024)	+	61,5°C	52°C	52°C	60,5°C
<i>M. smegmatis</i>	+	61,5°C	-	-	60,5°C
<i>M. senegalense</i> (ATCC 33027)	+	61,5°C	46°C	48°C	60,5°C
<i>M. porcinum</i> (ATCC 33776)	+	61,5°C	49°C	51°C	60,5°C
<i>M. gordonae</i> (DSMZ 44160)	+	61,5°C	-	42,5°C	60,5°
<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	+	61,5°C	51°C	42,5°C	60,5°
<i>M. genavense</i>	+	61,5°C	51°C	50°C	60,5°
III. nicht-mykobakterielle Actinomyceten					
<i>Nocardia farcinica</i> (ATCC 3318)	-				
<i>Nocardia brevicatena</i> (ATCC 15333)	-				
<i>Streptomyces griseus</i>	-				
<i>Rhodococcus equi</i>	-				
<i>Coryneb. pseudodiphtheriticum</i> (ATCC 10700)	+	43°C	44°C	44°C	47°C
<i>Coryneb. jeikeium</i>	+	44°C	44°C	44°C	47°C
<i>Coryneb. xerosis</i> (ATCC 373)	+				47°C

Mikroorganismus	Schmelztemperatur bei Hybridisierungssonden spezifisch für				
	erfindungsgemäß				Vergleich
	A*	Gattung III	Mycobacterium		Gattung II
			tuber- culosis	avium	
IV. Gram-positive Bakterien					
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	-				
<i>Bacillus cereus</i>	-				
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	-				
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	-				
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619)	-				
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19115)	-				
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	-				
V. Gram-negative Bakterien					
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 14153)	-				
<i>Escherchia coli</i> (ATCC 25922)	-				
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	-				
<i>Shigella sonnei</i> (ATCC25930)	-				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	-				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-				
<i>Moraxella catarrhalis</i> (ATCC 19115)	-				
VI. Pilze					
<i>Candida albicans</i>	-				
<i>Candida glabrata</i>	-				
<i>Candida crusei</i>	-				
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-				
<i>Fusarium</i>	-				

*) A: Amplifikation des 16S-rRNA-Fragments mit den
erfindungsgemäßen Gattungs-spezifischen Pri-
mern

+: Amplifikation erfolgt

-: Amplifikation nicht erfolgt

5 **Ansprüche**

1. Verfahren zum gemeinsamen und jeweils spezifischen Nachweis einer Mykobakterien-Infektion, des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex und/oder von *Mycobacterium avium* in klinischem Material umfassend die Schritte

a) Extraktion von mikrobieller DNA aus klinischem Material,

b) Vervielfachung von mindestens einem Fragment des 16S-rRNA-Gens aus der extrahierten DNA mittels eines Primerpaares umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 5 oder mittels zweier Primerpaare, wobei das eine Primerpaar die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 3 umfasst und das andere Primerpaar die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 5 umfasst,

c) Detektion der Gattungsspezifischen Region des vervielfachten 16S-rRNA-Fragments von Mykobakterien mittels eines Paares markierter Hybridisierungssonden, wobei das Paar die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 11 umfasst,

d) Detektion der Art-spezifischen Region des vervielfachten 16S-rRNA-Fragments von Mykobakterien mittels eines Paares markierter Hybridisi-

sierungssonden, wobei zum Nachweis des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex das Paar die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 7 oder die komplementären Sequenzen davon umfasst und wobei zum Nachweis von *Mycobacterium avium* das Paar die Nucleotidsequenzen von SEQ ID NO: 8/SEQ ID NO: 9 oder die komplementären Sequenzen davon umfasst, und —

5 e) wobei der gemeinsame, jeweils spezifische Nachweis von Mykobakterien und des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex und/oder von *Mycobacterium avium* während der Detektion gemäß der Schritte c) und d) mittels Schmelzkurvenanalyse erfolgt.

15 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die extrahierte mikrobielle DNA in Verfahrensschritt a) mit mindestens einem künstlichen Plasmid, die als interner Standard dient, vermischt wird, wobei das künstliche Plasmid eine Gattungsspezifische Region III der 16S-rRNA von Mykobakterien oder Teile davon umfasst, welche in ihrer Nucleotidsequenz modifiziert wurde, und wobei eine Schmelzkurvenanalyse zum spezifischen Nachweis der vervielfachten 16S-rRNA-Fragmente von Mykobakterien und der modifizierten 16S-rRNA-Fragmente des künstlichen Plasmids durchgeführt wird.

25 3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die extrahierte mikrobielle DNA aufgeteilt wird und ein erster Teil davon im Verfahren nach den Schritten a) bis e) von Anspruch 1 weiterbehandelt und ein zweiter Teil einem parallelen Verfahren unterzogen wird, umfassend die Schritte

- 5 a') Vermischen der extrahierten mikrobiellen DNA mit mindestens einem künstlichen Plasmid als interner Standard, wobei das künstliche Plasmid eine Gattungsspezifische Region III der 16S-rRNA von Mykobakterien oder Teile davon umfasst, welche in ihrer Nucleotidsequenz modifiziert wurde,
- 10 b') Vervielfachung der 16S-rRNA-Fragmente mittels mindestens einem Primerpaar ausgewählt aus der Gruppe umfassend die Nucleotidsequenzen-Paare SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 5,
- 15 c') Detektion der vervielfachten 16S-rRNA-Fragmente mittels eines Paares markierter Hybridisierungssonden, die mit der Gattungsspezifischen Region III des 16S-rRNA-Fragments von Mykobakterien hybridisieren, wobei das Paar die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 11 oder die komplementären Sequenzen davon umfasst, und
- 20 d') wobei zum spezifischen Nachweis der vervielfachten 16S-rRNA-Fragmente von Mykobakterien und der modifizierten 16S-rRNA-Fragmente des mindestens einen künstlichen Plasmids während der Detektion gemäß Schritt c') eine Schmelzkurvenanalyse erfolgt.
- 25

4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Vervielfachung der Genfragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Echtzeit-PCR, bevorzugt mittels LightCyclerTM-System, durchgeführt wird.

5 6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Detektion während oder nach der Vervielfachung der 16S-rRNA-Fragmente erfolgt.

7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Detektion mittels Echtzeit-PCR, besonders bevorzugt mittels LightCyclerTM-System erfolgt.

10 8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Detektion mittels Fluoreszenznachweis durchgeführt wird und wobei die markierten Hybridisierungssonden-Paare als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Paar ausgebildet sind.

15 9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die Vervielfachung der 16S-rRNA-Fragmente mittels Echtzeit-PCR, bevorzugt mittels LightCyclerTM-System, erfolgt.

20 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei die Detektion als quantitative Messung durchgeführt wird.

11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das klinische Material ausgewählt ist aus der Gruppe klinischer Proben bestehend aus Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Liquor, Knochenmark, Blut und Biopsien.

25

12. Oligonucleotid-Primerpaar, welches die Nucleinsäuren mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 3 aufweist.

5 13. Oligonucleotid-Primer, welcher die Nucleinsäuren mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 4 aufweist.

14. Oligonucleotid-Hybridisierungssonden-Paar, welches die Nucleinsäuren mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 6 und SEQ ID NO: 7 oder mit den komplementären Sequenzen davon aufweist.

10 15. Oligonucleotid-Hybridisierungssonden-Paar, welches die Nucleinsäuren mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8 und SEQ ID NO: 9 oder mit den komplementären Sequenzen davon aufweist.

15 16. Oligonucleotid-Hybridisierungssonden-Paar, welches die Nucleinsäuren mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 10 und SEQ ID NO: 11 oder mit den komplementären Sequenzen davon aufweist.

20 17. Künstliches Plasmid einsetzbar als interne Kontrolle der Vervielfachung und des Nachweises von 16S-rRNA-Fragmenten von Mykobakterien, umfassend modifizierte Sequenzen der Gattungsspezifischen Region III des 16S-rRNA-Gens.

25 18. Künstliches Plasmid nach Anspruch 17, wobei das künstliche Plasmid mindestens einen/eine Nucleotid-Austausch, -Addition, -Deletion und/oder -Inversion gegenüber der Wildtyp-Sequenz der Gattungsspezifischen Region III des 16S-rRNA-Gens aufweist.

19. Künstliches Plasmid nach Anspruch 17 oder 18,
umfassend die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 14 oder
SEQ ID NO: 15.

5 20. Künstliches Plasmid nach Anspruch 17 oder 18,
umfassend die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 16 oder
SEQ ID NO: 17.

10 21. Diagnose-Kit zum spezifischen Nachweis einer
Mykobakterien-Infektion und des *Mycobacterium tu-*
berculosis-Komplex und von *Mycobacterium avium* in
klinischem Material gemäß dem Verfahren nach einem
der Ansprüche 1 bis 10 umfassend:

a) mindestens eine Polymerase,
b) mindestens ein Primerpaar gemäß Anspruch 11,
15 c) mindestens ein Primerpaar enthaltend einen
Primer gemäß Anspruch 13, das die Gattungs-
spezifische Region III von Mykobakterien
amplifiziert.

20 d) ein Hybridisierungssonden-Paar gemäß Anspruch
16 zur Detektion der Gattungs-spezifischen
Region III,

e) mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar ge-
mäß den Ansprüchen 14 bis 15 zur Detektion
der Art-spezifischen Regionen.

25 22. Diagnose-Kit nach Anspruch 21, beinhaltend ein
künstliches Plasmid gemäß einem der Ansprüche 17
bis 19.

Zusammenfassung

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft ein molekular-
biologisches Verfahren zum spezifischen Nachweis
von Mykobakterien und zur Differenzierung des *Myco-
bakterium tuberculosis*-Komplex und *Mycobakterium*
15 *avium* von anderen Mykobakterien in klinischem Mate-
rial mittels Amplifikations-Primer und Oligonucleo-
tid-Sonden, die spezifisch für die Gattungs- und
Art-spezifischen Regionen des 16S-rRNA-Gens von
Mykobakterien sind.

16S rRNA Gen von *M. tuberculosis* (1523bp)

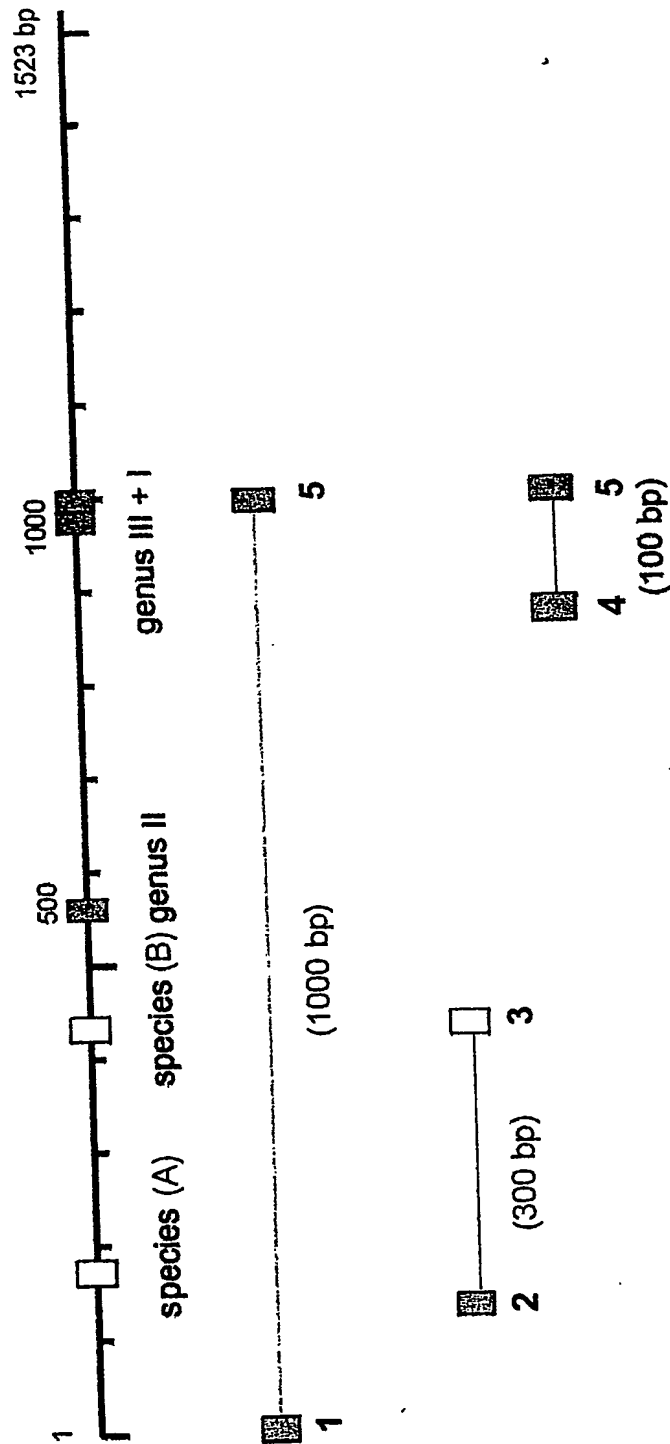


FIG. 1

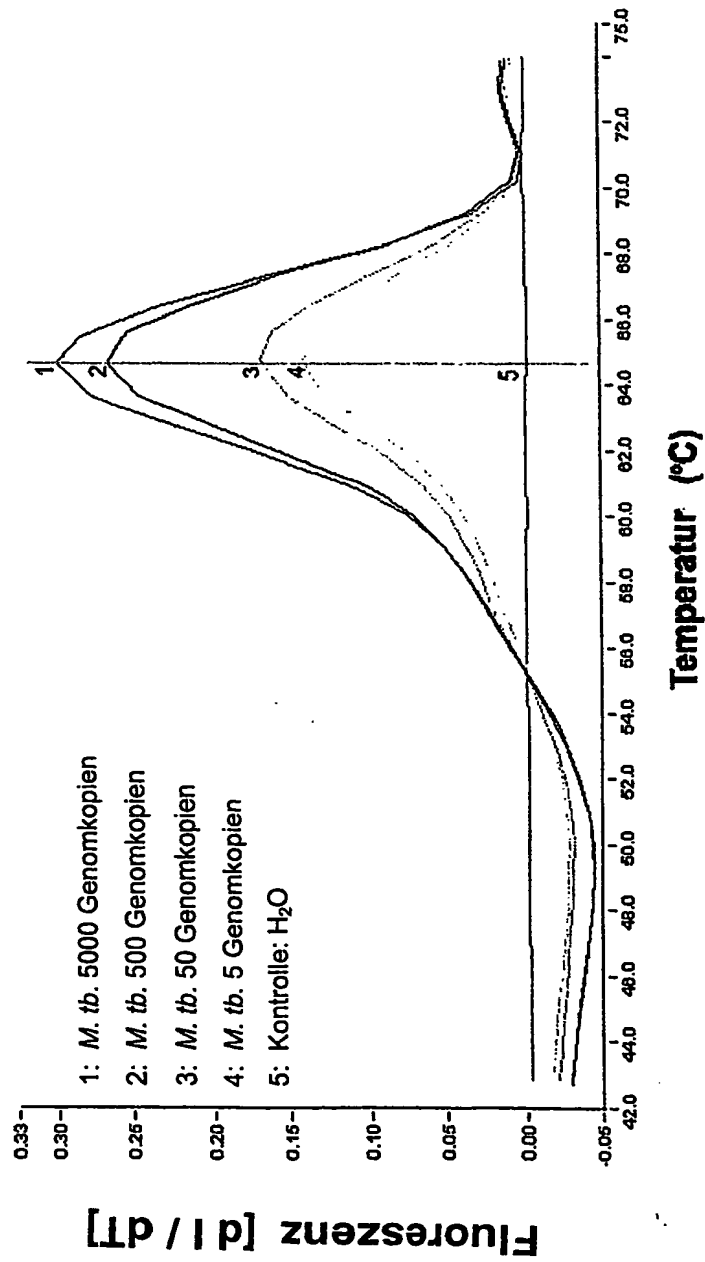


FIG. 2

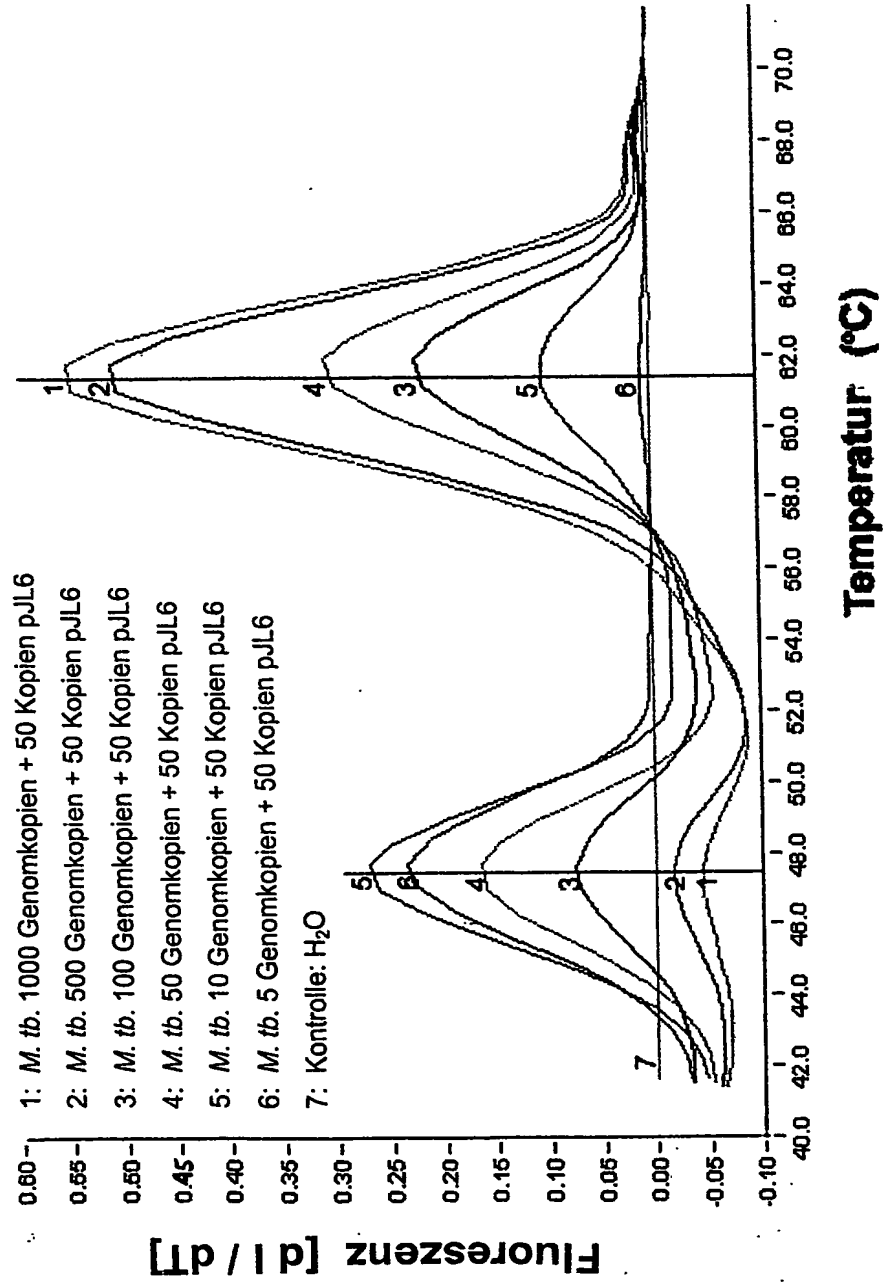


FIG. 3

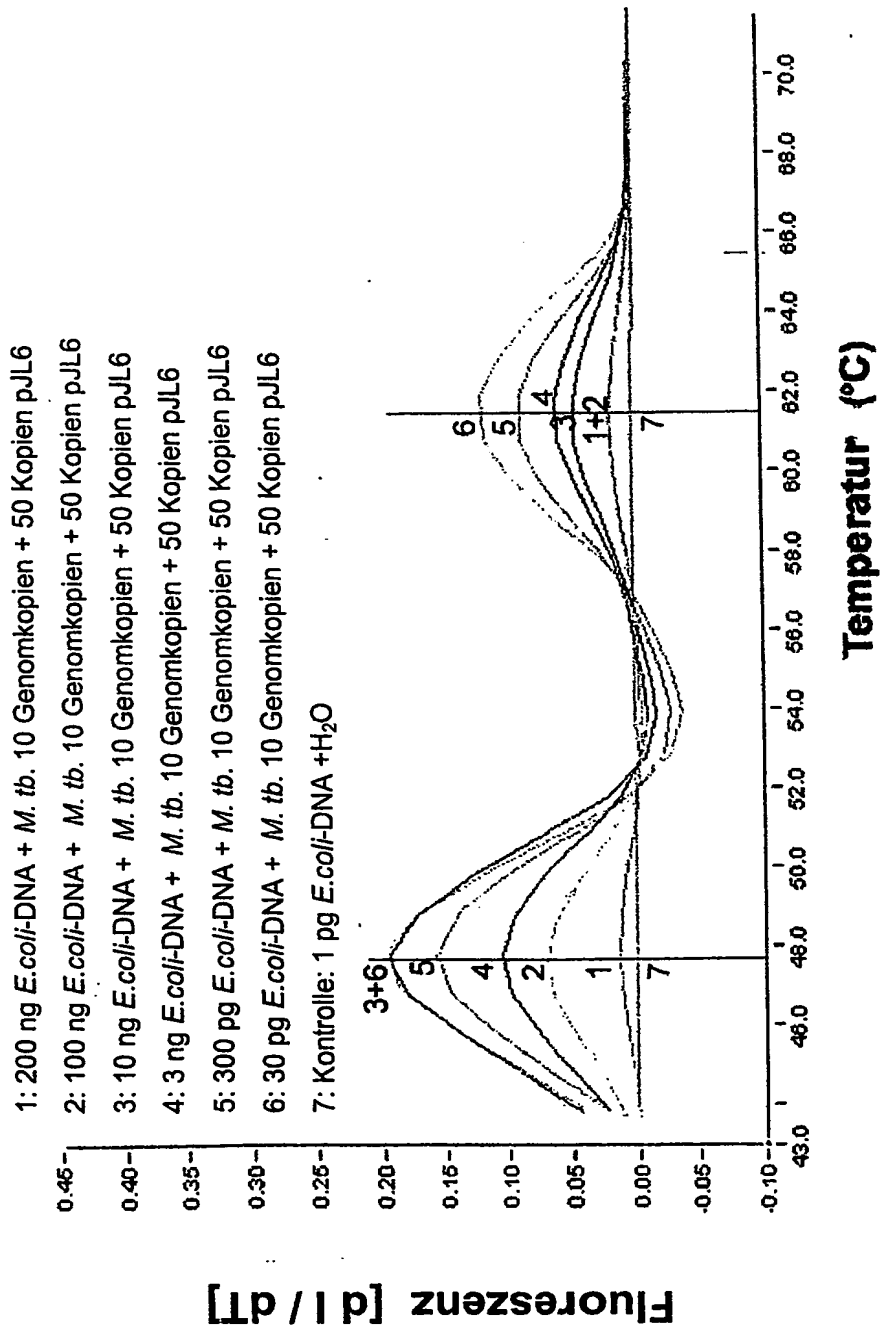


FIG. 4

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Cytonet GmbH & Co. KG

<120> Nachweis von Mykobakterien in klinischem Material

<130> 17059

<140>

<141>

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 1

agtttgatc ctggctcagg a

21

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 2

gataagcctg ggaaactg

18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 3

ctaccgtcaa tccgagag

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 4

ggcggagcat gtggatta

18

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 5

tgacacagg ccacaagga

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 6

cgcggggtca tcccacaccg

20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 7

taaagcgctt tccaccacaa ga

22

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 8

cgcgggccca tcccacaccg

20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 9

aaaagctttc caccagaaga c

21

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 10

gcaacgcgaa gaaccttacc tgg

23

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 11

tttgacatgc acaggacg

18

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 12

gagtttgatc ctggctcagg a

21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Mycobacterium sp.

<400> 13

aaggaggtga tccagccgca

20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifikation
der 16S rDNA

<400> 14

ggcttgacat gcacaggacg c

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifikation
der 16S rDNA

<400> 15

gcgtcctgtg catgtcaagc c

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifikation
der 16S rDNA

<400> 16

gtttgacat aacttgacg c

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifikation
der 16S rDNA

<400> 17

gcgtccagtg tatgtcaaac c

21

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.